

EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG
VON EUTERPATHOGENEN
COLIFORMEN KEIMEN
GEGENÜBER POLYMYXIN B

Johann Schneemeier

Guss
München
1905



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554811_0050

Aus der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik
der Universität München

Lehrstuhl: Prof. Dr. M. Rüsse

Arbeit angefertigt unter Leitung von Prof. Dr. K. Walser

EMPFINDLICHKEITSPRÜFUNG VON EUTERPATHOGENEN COLIFORMEN
KEIMEN GEGENÜBER POLYMYXIN B

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Johann Schneemeier
aus
Zusmarshausen

München 1985

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl
Referent: Prof. Dr. K. Walser
Korreferent: Prof. Dr. J. Gropp

Tag der Promotion: 22. Februar 1985

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG.....	1
2. LITERATURÜBERSICHT.....	2
2.1. Polymyxin B.....	2
2.1.1. Geschichte und Herkunft des Polymyxin B.	2
2.1.2. Chemie der Polymyxine und Standardi- sierung.....	3
2.1.3. Antibakterielle Wirksamkeit und MHK.....	4
2.1.4. Wirkungsweise von Polymyxin B.....	6
2.1.5. Wirkungsmechanismus.....	8
2.1.6. Wirkungsintensität und Inaktivierung....	9
2.1.7. Resistenzbildung.....	11
2.1.8. Pharmakokinetik.....	12
2.1.8.1. Resorption.....	12
2.1.8.1.1. Orale Verabreichung.....	12
2.1.8.1.2. Parenterale Verabreichung.....	13
2.1.8.1.2.1. Intramuskuläre Applikation.....	13
2.1.8.1.2.2. Intravenöse Applikation.....	16
2.1.8.2. Verteilung von Polymyxin B.....	18
2.1.8.3. Ausscheidung von Polymyxin B.....	21
2.1.8.3.1. Ausscheidung über die Galle.....	21
2.1.8.3.2. Ausscheidung über die Niere.....	22
2.1.9. Nebenwirkungen.....	23
2.1.9.1. Neurotoxizität.....	24
2.1.9.2. Nephrotoxizität.....	25

	Seite
2.1.9.3. Lokale Nebenwirkungen.....	26
2.1.9.4. Allergische Nebenwirkungen.....	27
2.1.10. Indikation und Anwendung.....	27
2.1.11. Intramammäre Applikation.....	29
3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....	34
3.1. Allgemeines.....	34
3.2. Material.....	35
3.3. Methodik.....	36
3.3.1. Bakteriologische Untersuchung.....	36
3.3.1.1. Anreicherung und Isolierung.....	36
3.3.1.2. Resistenzbestimmung.....	37
3.3.1.3. Differenzierung der coliformen Keime....	39
3.3.2. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentra- tion im Agar-Verdünnungs-Verfahren	40
3.3.2.1. Allgemeines.....	40
3.3.2.2. Herstellung der Stammlösung.....	41
3.3.2.3. Herstellung der Verdünnungsreihe.....	41
3.3.2.4. Herstellung der Agar-Platten.....	44
3.3.2.5. Beimpfen der Agar-Platten.....	46
3.3.2.5.1. Einstellen der Keimzahl.....	46
3.3.2.5.2. Ausstreichen des Inokulums.....	49
3.3.2.6. Auswertung und statistische Berechnung	49
4. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.....	51
4.1. Häufigkeit der coliformen Keime.....	51
4.2. Häufigkeit von E.coli.....	51
4.3. Ergebnis des Resistenztestes.....	51

	Seite
4.4.	Die minimale Hemmkonzentration..... 54
4.4.1.	MHK bei coliformen Keimen..... 56
4.4.2.	MHK bei E.coli..... 57
4.4.3.	MHK bei coliformen Keimen außer E.coli.... 59
4.4.4.	MHK beim Kontrollstamm..... 61
5.	DISKUSSION..... 62
5.1.	Häufigkeit der coliformen Keime bei akuten Mastitiden..... 62
5.1.1.	Methodik..... 62
5.1.2.	Ergebnis..... 63
5.2.	Diskussion der Resistenzlage..... 63
5.2.1.	Methodik..... 63
5.2.2.	Ergebnis..... 64
5.3.	Diskussion der MHK-Bestimmung..... 65
5.3.1.	Methodik..... 65
5.3.2.	Ergebnis..... 68
6.	ZUSAMMENFASSUNG..... 71
7.	SUMMARY..... 72
8.	LITERATURVERZEICHNIS..... 73
LEBENS LAUF	

1. EINLEITUNG

Obwohl akute Mastitiden nur sporadisch auftreten, spielen sie in der tierärztlichen Praxis eine erhebliche Rolle. Volkswirtschaftlich scheint die akute Mastitis des Rindes im Vergleich zur chronischen Mastitis eine untergeordnete Bedeutung zu haben, im Einzelfall sind jedoch erhebliche Verluste zu beobachten, da die akute Euterentzündung vielfach mit lebensbedrohlichen Allgemeinstörungen einhergeht.

Coliforme Keime, insbesondere *E. coli*, sind mit Abstand am häufigsten ursächlich an einer akuten Mastitis beteiligt.

Nach Berichten aus der Literatur und aus praktischer Erfahrung gilt Polymyxin B für die Therapie von coliformen Mastitiden als Mittel der Wahl, da eine äußerst geringe Resistenzquote zu erwarten ist. Da über die Dosierung von Polymyxin B noch keine exakten Angaben vorliegen, ist es das Ziel der vorliegenden Arbeit, durch die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Polymyxin B gegenüber coliformen Keimen die Grundlage für eine Dosierungsempfehlung zu schaffen.

2. LITERATURÜBERSICHT

2.1. Polymyxin B

2.1.1. Geschichte und Herkunft des Polymyxin B

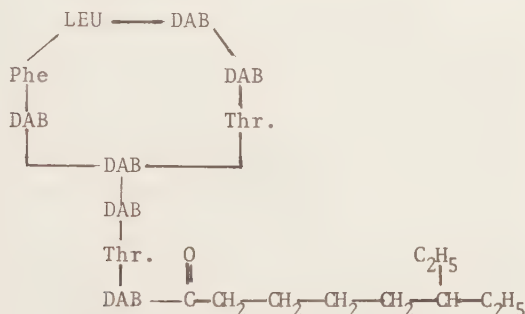
Polymyxine stellen eine Gruppe von Antibiotika mit peptidartiger Struktur dar. Im chemischen Aufbau besteht zwischen den einzelnen Polymyxinen große Ähnlichkeit.

Im Jahr 1947 entdeckten zwei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander eine antibiotisch wirkende Substanz. Die britische Arbeitsgruppe (AINSWORTH, BROWN, BROWNLEE) isolierten aus *Bacillus aerosporus* einen Wirkstoff, den sie Aerosporin nannte. Die amerikanische Forschungsgruppe (BENEDICT; LANGLYKKE) gab der aus *Bacillus polymyxa* isolierten Substanz den Namen Polymyxin.

Nachdem die Identität dieser beiden Substanzen festgestellt wurde, einigte man sich auf den Namen Polymyxin A. Ebenfalls 1947 fanden STANSLY et al. ein weiteres Polymyxin, das nun als Polymyxin D bekannt ist. Im Jahre 1949 wurde von BROWNLEE et al. ein drittes Polymyxin, nämlich das Polymyxin B isoliert. Die gleiche Gruppe entdeckte weiterhin Polymyxin C und Polymyxin E, welches mit Colistin identisch ist (BROWNLEE et al., 1952).

2.1.2. Chemie der Polymyxine und Standardisierung

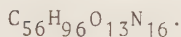
Polymyxine sind basische Dekapeptide. Sie bestehen aus einem cyclischen Heptapeptid mit einem Tripeptid als Seitenkette, an dessen Ende sich eine Fettsäure befindet (FORTH et al., 1980).



(FRIMMER, 1977).

Polymyxin B enthält die Aminosäuren L-Threonin (2), D-Leucin (1), D-Phenylalanin (1) und α, γ -Diaminobuttersäure (6) bzw. die Fettsäure 6 Methyl-Oktansäure.

Das Molekulargewicht beträgt 1201. Die Summenformel lautet



Polymyxin B ist ein schwach gelbliches, geruchloses Pulver, das sich durch lange Haltbarkeit und durch eine gute Thermostabilität auszeichnet. Polymyxin B ist sowohl in Wasser als auch in Methanol gut löslich. Die Löslichkeit in höheren Alkoholen und in organischen Lösungsmitteln ist jedoch gering.

Die wässrige Lösung ist bei pH-Werten von 3,0 - 5,0 thermostabil. In stark saurem und alkalischem Milieu vermindert sich die Haltbarkeit erheblich (14 Tage bei +4⁰Celsius) (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Die Dosierungsangaben für Polymyxin B erfolgen in der Regel auf Gewichtsbasis. In älteren Veröffentlichungen werden noch Angaben in Internationalen Einheiten (I.E.) gegeben. Das internationale Standardpräparat (WHO) von Polymyxin B enthält 7874 I.E. Zur Umrechnung auf Gewichtseinheiten gilt:

7874 I.E. = 1 mg Polymyxin B.

2.1.3. Antibakterielle Wirksamkeit und MHK

Das Wirkungsspektrum von Polymyxin B beschränkt sich nach WALTER und HEILMEYER (1975) auf gramnegative Keime. Erfasst werden vor allem *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, Klebsiellen, Pasteurellen, Salmonellen, Shigellen, *Hämophilus*-Arten und in-vitro auch Brucellen.

Unempfindlich gegenüber Polymyxin B sind *Proteus*, alle grampositiven Keime, Neisserien, Mykobakterien, Corynebakterien, Sporenbildner und Pilze.

Folgende minimale Hemmkonzentrationen für die einzelnen Keime werden von WALTER und HEILMEYER (1975) angegeben:

	MHK ($\mu\text{g/ml}$)
<i>E. coli</i>	0,1 - 20
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0,4 - 20
<i>Haemophilus pertussis</i>	0,1 - 10
<i>Pseudomonas</i>	0,2 - 20
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0,3 - 8
<i>Pasteurella tularensis</i>	0,5 - 5
<i>Salmonella</i>	0,2 - 2,5
<i>Shigella</i>	0,1 - 3
<i>Pasteurella</i>	0,1 - 1
<i>Proteus</i>	resistent

BROWNLEE et al. (1952) berichten von künstlich mit *Haemophilus pertussis* und *Salmonella typhosa* infizierten Mäusen, die mit Polymyxin B behandelt wurden. Bei genügend hoher Dosierung überlebten die behandelten Tiere, während die unbehandelten Kontrolltiere verendeten.

Weiterhin ergab sich bei ihren Untersuchungen, daß alle von ihnen getesteten *E. coli*-Stämme eine Empfindlichkeit gegenüber Polymyxin B aufwiesen.

ZIV (1980a) berichtet von 592 gramnegativen Keimen (*E. coli*; *Enterobacter aerogenes*; *Salmonella*; *Klebsiella*; *Pseudomonas aeruginosa*), die alle gegenüber Polymyxin B empfindlich waren. Mit Ausnahme von 10 Stämmen lag die minimale Hemmkonzentration von Polymyxin B gegenüber diesen Keimen unter $2,0 \mu\text{g/ml}$. 75% der isolierten Keime zeigten eine Wachstumshemmung bei einer Wirkstoffkonzentration von $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$.

2.1.4. Wirkungsweise von Polymyxin B

Bei Polymyxin B ist sowohl eine bakteriostatische als auch eine bakterizide Wirkung festzustellen. Während die bakteriostatische Wirkung grundsätzlich vorhanden ist, hängt die bakterizide Wirkung von der jeweiligen Konzentration an zugesetztem Polymyxin B ab. Bei etwa 50% der empfindlichen Keime tritt eine bakteriostatische und eine bakterizide Wirkung ein. Bei 30% der Keime muß die Konzentration von Polymyxin B verdoppelt werden, wenn man einen bakteriziden Effekt erreichen will. Bei den restlichen 20% der Keime ist zur Erreichung der Bakterizidie eine 3- bis 5-fache Erhöhung der Konzentration erforderlich. Abgetötet werden durch Polymyxin B nur extrazellulär befindliche Bakterien. Dadurch läßt sich die klinische Unwirksamkeit von Polymyxin B gegenüber Brucellen, die in vitro gegenüber Polymyxin B empfindlich sind, erklären (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Über die Kinetik der Bakterizidie von Polymyxin B schreiben STILLE und SHAH (1973), daß bei in vitro-Versuchen bereits nach 6 Minuten eine 99%ige Abtötung von E.coli durch Polymyxin B in einer Konzentration von 2 µg/ml erreicht wird (Abb. 1).

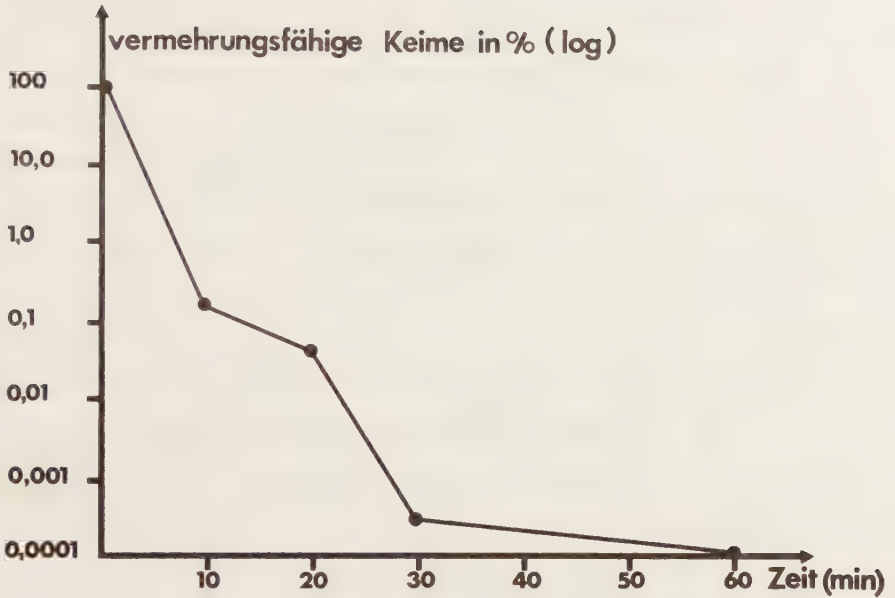


Abb. 1: Kinetik der Bakterizidie von 2 $\mu\text{g/ml}$ Polymyxin B gegenüber E.coli (STILLE u. SHAH, 1973).

Aus ihren Versuchen ist weiterhin zu ersehen, daß bei Polymyxin B die bakterizide Wirkung eindeutig konzentrationsabhängig ist (Abb. 2).

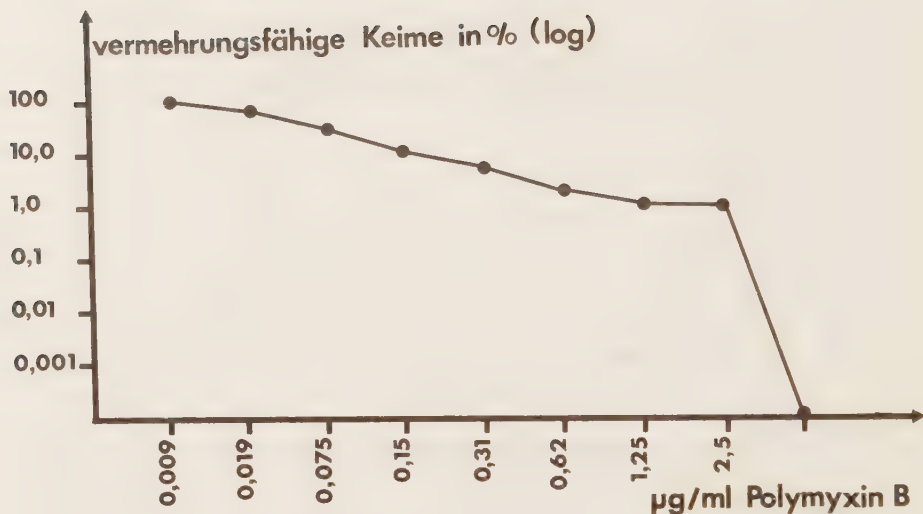


Abb. 2: Dosis-Wirkungsrelation der Bakterizidie von Polymyxin B gegenüber E.coli (exp. 20 min.) (STILLE u. SHAH, 1973).

2.1.5. Wirkungsmechanismus

Nach WALTER und HEILMEYER (1975) erklärt sich die antibakterielle Wirkung von Polymyxin B durch eine Wechselwirkung zwischen Polymyxin B und der Zytoplasmamembran der Bakterienzelle. Polymyxin B lagert sich an die Phospholipid-Komponente der Membran an und stört sowohl die aktiven als auch passiven Transportmechanismen der Bakterien, so daß es schließlich zur Zerstörung der Zelle kommt.

Polymyxine und Tyrothricin sind die einzigen Antibiotika, die direkt an der Zytoplasmenmembran angreifen. Aufgrund ihrer grenzflächenaktiven Eigenschaften lagern sie sich in die Zellmembran ein. Es kommt zu einer Desintegration der Zellwand und damit zu einer Beeinträchtigung ihrer Funktion als osmotische Barriere. Die Erhöhung der Permeabilität führt u.a. durch Verluste wichtiger Metabolite und Enzyme zu einer letalen Insuffizienz des Bakterienstoffwechsels (FORTH et al., 1980).

2.1.6. Wirkungsintensität und Inaktivierung

Die in vitro-Wirksamkeit von Polymyxin B ist stark abhängig von der Keimzahl des Inokulums. So werden für den antibakteriellen Effekt 8- bis 10-fach höhere Konzentrationen von Polymyxin B benötigt, wenn die Keimzahl/ml von 10^3 auf 10^7 vergrößert wird (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Die Intensität der in vitro-Wirksamkeit von Polymyxin B ist nur schwer aufgrund eines Blättchentestes zu erfassen, da die Diffusionsfähigkeit der Polymyxine sehr gering ist. Der Hemmhofdurchmesser beim Blättchentest läßt demnach keine genauen Rückschlüsse auf die Wirkungsintensität oder sogar auf die minimale Hemmkonzentration zu (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Durch die Anlagerung von zweiwertigen Kationen wie Mangan, Magnesium und Eisen an Polymyxin B wird dessen Wirksamkeit

herabgesetzt. Dieser Wirkungsverlust ist darin begründet, daß durch die Anlagerung von Kationen der Einbau des Polymyxin B in die bakterielle Zellwandstruktur eingeschränkt ist.

Durch ungesättigte Fettsäuren und bei Anlagerung an Gewebezellen tritt ebenso ein Wirkungsverlust auf (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Nach CRAIG und KUNIN (1973) tritt im Serum ein Aktivitätsverlust ein, der bis zu 50% betragen kann. Durch die hohe Affinität des Polymyxin B für Serumproteine ist dies zu erklären. Zum Zeitpunkt der höchsten Serumkonzentration liegt Polymyxin B zu etwa 45% in gebundener Form vor. Der prozentuale Anteil des an Eiweiß gebundenen Polymyxin B steigt mit abnehmender Serumkonzentration auf Werte bis zu 58% (ZIV et al., 1980b).

Nach Berichten von REIMER et al. (1981), die die minimalen Hemmkonzentrationen von mehreren Antibiotika gegen Standard-Kontroll-Stämme mit und ohne Zusatz von Humanserum untersuchten, ergibt sich ein eindeutiger Wirkungsverlust von Polymyxin B bei Zugabe von Humanserum.

Bei den Versuchen wurde Müller-Hinton-Agar verwendet, der mit 50 mg Ca und 20 mg Mg pro Liter angereichert und im Verhältnis 1:1 mit Humanserum vermischt wurde. Für alle Testkeime ergab sich ein Anstieg der minimalen Hemmkonzentration gegenüber den Kontrollversuchen mit normalem Müller-Hinton-Agar.

Für diesen wirkungshemmenden Effekt sind sowohl das zugesetzte Ca und Mg als auch die Bestandteile des Serums (Anionen, Kationen, Aminosäuren) und die Serumproteine verantwortlich.

Im Gegensatz dazu berichtet GARROD (1978) von einer nicht näher beschriebenen Interaktion von Polymyxin B und Serum, die einen positiven synergistischen antibakteriellen Effekt gegen *E. coli* hervorruft.

2.1.7. Resistenzbildung

Resistenzbildung von Keimen gegenüber Polymyxin B spielt im klinischen Bereich keine Rolle und ist nur in Einzelfällen beobachtet worden.

In vitro ist eine Resistenzbildung möglich. Sie hängt von der Keimart, der Keimkonzentration und der primären Empfindlichkeit ab (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Bei 131 *E.coli*-Stämmen, die SOGAARD (1982) auf Empfindlichkeit gegenüber Polymyxin B untersuchte, traten keine resistenten Stämme auf.

Eine israelische Untersuchung über die Empfindlichkeit von coliformen Keimen wurde von SARAN (1980) durchgeführt. Von 119 isolierten coliformen Stämmen waren 10,9% unempfindlich gegenüber Polymyxin B.

2.1.8. Pharmakokinetik

2.1.8.1. Resorption

2.1.8.1.1. Orale Verabreichung

WALTER und HEILMEYER (1975) gehen davon aus, daß eine Resorption nach oraler Verabreichung nicht oder nur in geringem Maße stattfindet.

BROWNLEE et al. (1952) untersuchten die Resorption von Polymyxin B aus dem Verdauungstrakt und kamen zu dem Ergebnis, daß eine Resorption von Polymyxin B nach oraler Applikation beim erwachsenen Individuum nicht stattfindet.

Weder beim Kaninchen, noch beim Hund, noch beim Menschen kann durch eine orale Verabreichung in einer therapeutisch sinnvollen Dosis ein zufriedenstellender Polymyxin-Blutspiegel erreicht werden. Bei Mäusen kann nach oraler Gabe von sehr großen Mengen Polymyxin B, welche die LD₅₀ jedoch bei weitem überschreiten, ein Serumspiegel erzielt werden, der therapeutisch ausgenützt werden könnte.

Im Magen-Darm-Kanal von Neugeborenen findet jedoch eine Resorption statt. Bei Meerschweinchen, die noch keine 24 Stunden alt sind, ist nach oraler Applikation ein relativ hoher Polymyxin B-Blutspiegel feststellbar. Bis zur 48. Lebensstunde findet beim Kalb eine Polymyxin B-Resorption aus dem Magen-Darm-Kanal statt.

Von dem per os verabreichten Polymyxin B ist nur ein geringer Anteil in biologisch aktiver Form in den Faeces wieder auffindbar. Durch bakteriologische Untersuchungen des Kotes konnte der Einfluß von peroral verabreichtem Polymyxin B auf die fäkale Keimflora ermittelt werden.

Beim erwachsenen Menschen wurden am dritten Tag nach einer Applikation von 100.000 I.E./kg Körpergewicht im Kot nur noch 80.000 Keime pro g Faeces gefunden, wobei 60.000 Keime unempfindlich gegen Polymyxin B waren. E. coli-Keime konnten im Kot von behandelten Personen nicht mehr nachgewiesen werden (BROWNLEE et al., 1952).

2.1.8.1.2. Parenterale Verabreichung

2.1.8.1.2.1. Intramuskuläre Applikation

Nach intramuskulärer Injektion wird Polymyxin B schnell resorbiert. Bereits nach 30 Minuten können Serumwerte festgestellt werden, die nach 2 Stunden ein Maximum erreichen und nach etwa 6 Stunden um die Hälfte abgefallen sind.

Beim Menschen werden nach intramuskulärer Gabe von 2 - 4 mg/kg Körpergewicht maximale Serumwerte von 1 - 8 µg/ml erreicht. Eine Kumulation ist bei üblicher Dosierung und normalen Ausscheidungsverhältnissen nicht zu erwarten (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Nach Untersuchungen am Menschen, Hund und Kaninchen wird nach intramuskulärer Applikation Polymyxin B rasch ins Blut aufgenommen, bleibt im Serum und dringt nicht in die Blutzellen ein. Der Blutspiegel steigt innerhalb der 1. Stunde

maximal an und fällt nach der 4. Stunde auf relativ geringe Werte zurück (BROWNLEE, 1952).

ZIV et al. (1980a) untersuchten die Pharmakokinetik von Polymyxin B nach intramuskulärer Injektion bei Kälbern. Zu den Versuchen wurden Kälber im Alter von 4 - 5 Wochen und einem Körpergewicht von 45 - 65 kg herangezogen. Jedem Kalb wurde im 24-Stunden-Abstand Polymyxin B intramuskulär verabreicht. Bei der ersten Versuchsgruppe lag die Dosierung bei 2,5 mg/kg und bei der zweiten 5,0 mg/kg. 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 und 24 Stunden nach jeder Injektion wurde der Polymyxin B-Serumwert bestimmt.

An Hand der Versuchsergebnisse wird deutlich, daß die Serumkonzentration von Polymyxin B von der Dosis abhängig ist. Die höchsten Serumwerte wurden 1 Stunde nach der Behandlung festgestellt. Die Ausscheidungs-Halbwertszeit lag bei etwa 4 - 5 Stunden. Es ergaben sich keine Anzeichen für eine Kumulation von Polymyxin B im Serum. In Tabelle 1 sind die Ergebnisse zahlenmäßig erfaßt.

ZIV und SULMAN (1973) untersuchten bei Milchkühen und Schafen die Permeabilität der Milchdrüse für Polymyxin B und andere großmolekulare Antibiotika. Im Versuch wurde Polymyxin B durch eine einmalige intramuskuläre Injektion Kühen und Schafen verabreicht. Kühe wurden mit einer Dosierung von 3,5 mg/kg und die Schafe mit 7,5 mg/kg behandelt. Bei den Schafen konnte Polymyxin B bis zur 11. Stunde nach der Behandlung in der Milch festgestellt werden. Die ersten

Tab. 1: Serumkonzentration ($\mu\text{g/ml}$) von Polymyxin B bei Kälbern. Die Tiere wurden 3 Tage lang täglich mit Polymyxin B (intramuskulär) behandelt (ZIV et al., 1980a).

Stunden nach d. Behandl.	2,5 mg/kg/Tag			5,0 mg/kg/Tag		
	1.Tag	2.Tag	3.Tag	1.Tag	2.Tag	3.Tag
1	2,7	2,2	2,4	5,3	4,7	5,3
2	2,1	2,3	2,3	4,2	4,8	4,3
3	1,9	2,0	2,0	3,4	3,5	3,3
4	1,5	1,6	1,8	2,9	3,1	2,8
6	1,2	1,3	1,5	1,8	2,6	1,8
8	1,82	0,94	1,1	1,4	1,9	1,4
12	0,45	0,59	0,64	0,91	1,3	0,99
24	0,25	0,29	0,25	0,31	0,46	0,36

meßbaren Werte in der Milch erhielt man 2 Stunden nach der Injektion. Die niedrigere Dosierung bei den Kühen ergab auch eine geringere Milchkonzentration. Eine Ausscheidung von Polymyxin B über die Milch war 8 Stunden nach der Behandlung nicht mehr nachweisbar. Bei den Kühen erhielt man 2 Stunden nach der Injektion die ersten Polymyxin B-Werte in der Milch (Tab. 2).

Das Verhältnis von Milch- zur Serumkonzentration war sehr unterschiedlich und ließ keine Gesetzmäßigkeiten erkennen. Es lag im Bereich von 0,14 bis 0,32.

Tab. 2: Konzentration von Polymyxin B ($\mu\text{g/ml}$) im Serum und in der Milch bei Rind und Schaf (S = Serum, M = Milch) (ZIV u. SULMANN, 1973).

Tierart	Stunden nach der Behandlung													
	1		2		5		6,5		8		9,5		11	
	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M	S	M
Kuh (3,5mg)	3,1	-	5,2	0,8	3,7	1,2	3,0	0,9	2,4	-	1,5	-	1,5	-
Schaf (7,5mg)	12,5	2,8	21,2	3,7	14,7	2,1	8,0	2,0	7,8	1,7	6,0	1,0	6,7	0,9

2.1.8.1.2.2. Intravenöse Applikation

ZIV et al. (1982a) untersuchten die Pharmakokinetik von Polymyxin B nach intravenöser Applikation beim Kalb. Die Serumwerte wurden in der 1. Stunde alle 10 Minuten, in der 2. Stunde zweimal und dann nach der 3., 4., 5., 6., 8. und 10. Stunde gemessen. Bei der intravenösen Injektion in die Jugularvene wurde eine Dosierung von 5 mg/kg gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3 abzulesen.

Die mittlere Ausscheidungs-Halbwertszeit für Polymyxin B beträgt 160 min.

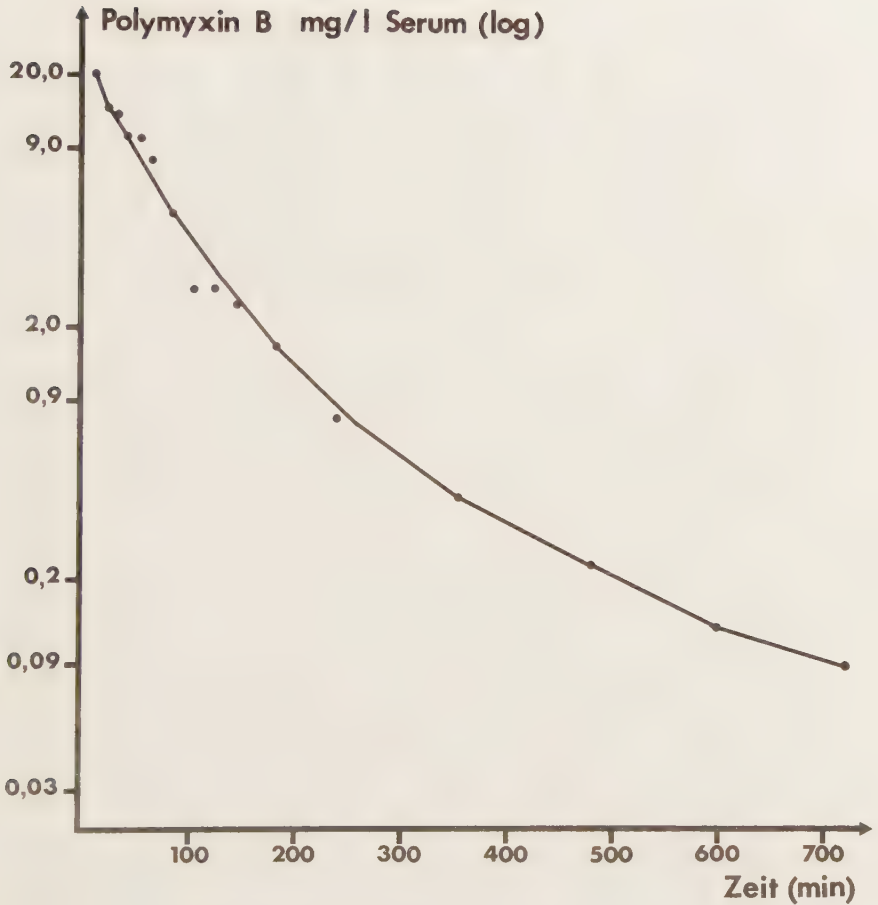


Abb. 3: Serumkonzentration von Polymyxin B (mg/Liter) bei einem Kalb nach einer einmaligen intravenösen Injektion von 5 mg/kg (ZIV et al., 1982a).

2.1.8.2. Verteilung von Polymyxin B

Da sich Polymyxin B an die Oberfläche von Gewebezellen ebenso anlagert wie an Bakterien, ist es in der Leber, Niere, Lunge, Muskulatur und im Gehirn noch 72 Stunden nach einer Injektion nachweisbar, obwohl es im Serum bereits verschwunden ist. Bei wiederholter Applikation tritt im Gewebe eine Kumulation auf.

Diese Eigenart des Polymyxin B erschwert die genaue Darlegung der Pharmakokinetik und ist sowohl für die Toxizität als auch für den therapeutischen Einsatz von Bedeutung (KUNIN u. BUGG, 1971; zit. nach GARROD, 1978).

ZIV et al. (1982a) untersuchten die Affinität von Polymyxin B für bestimmte Gewebe. Die Versuche wurden an 4 - 5 Wochen alten Kälbern durchgeführt. Polymyxin B wurde in einer Dosis von 5 mg/kg intravenös appliziert. Die Konzentration von freiem und an Gewebe gebundenem Polymyxin B ist in Tabelle 3 wiedergegeben.

In den Organen Niere, Leber, Lunge, Herz und Skelettmuskulatur fand man wesentlich größere Mengen Polymyxin B in gebundener Form als in freier. Die höchsten Konzentrationen waren in der Niere, der Leber, der Lunge, im Gehirn und im Herzmuskel.

Im Gehirn trat Polymyxin B nur in gebundener Form auf.

Tab. 3: Die Konzentration von freiem und an Gewebe gebundenem Polymyxin B in den Organen und Körperflüssigkeiten eines Kalbes nach einer einmaligen intravenösen Injektion von Polymyxin B (5,0 mg/kg).

Organ	Stunden nach der Injektion (Konzentration: $\mu\text{g/ml}$ oder g)									
	4		8		12		24		48	
	frei	gebund.	frei	gebund.	frei	gebund.	frei	gebund.	frei	gebund.
Niere	1,2	44,3	1,8	37,5	1,5	32,2	0,50	25,8	0,36	19,8
Leber	1,6	30,0	2,7	24,6	1,1	23,2	0,88	12,6	0,75	8,2
Lunge	1,0	8,8	0,70	15,4	0,46	15,2	0,40	14,3	0,36	13,2
Herz	0,92	12,5	0,40	26,8	0,44	27,6	0,32	18,7	0,40	8,0
Skel.Muskulatur	0,78	4,0	0,58	5,2	0,40	4,4	0,44	5,2	-	3,8
Gehirn	-	24,6	-	16,8	-	12,3	-	10,0	-	8,2
Galle	37,5	-	48,3	-	74,6	-	31,8	-	11,0	-
Urin	62,0	-	132,0	-	214,0	-	332,0	-	93,0	-
Serum	1,35	0,65	0,7	0,34	0,35	0,18	-	-	-	-

Aus Tabelle 4 ist ersichtlich, daß innerhalb der ersten 24 Stunden nach einer Behandlung mehr als 50% des verabreichten Polymyxin B noch im Gewebe vorhanden ist. Die prozentual größte Menge befindet sich in der Skelettmuskulatur.

24 bzw. 48 Stunden nach der Behandlung - zu diesem Zeitpunkt ist Polymyxin B im Serum nicht mehr nachweisbar - enthält die Skelettmuskulatur immer noch 41,9% bzw. 28,3% des verabreichten Polymyxin B.

Tab. 4: Die Menge von Polymyxin B (in %) in den Organen und Körperflüssigkeiten von Kälbern nach einer einmaligen intravenösen Injektion von Polymyxin B (5 mg/kg) (ZIV et al., 1982a).

Organe	Stunden nach der Injekt. (% d.verabr. Dosis)				
	4	8	12	24	48
Niere	2,71	2,34	2,00	1,56	1,20
Leber	9,86	8,52	7,58	4,21	2,79
Lunge	1,89	3,11	3,02	2,84	2,62
Herz	1,50	3,05	3,14	2,13	0,94
Skel.-Muskulatur	35,60	43,10	32,80	41,90	28,30
Gehirn	2,90	1,97	1,44	1,18	0,96
Galle	0,10	0,13	0,40	1,10	1,00
Urin	-	31,60	36,40	46,40	63,20
Serum	0,48	0,25	0,13	-	-
total	71,8	93,80	86,90	101,3	101,00

In den meisten Organen erreicht die Konzentration an gebundenem Polymyxin B ein bestimmtes Maximum und verändert sich dann nicht mehr signifikant. Dies ist auch der Fall, wenn die Dosis erhöht wird und die Injektion mehrmals wiederholt wird.

Diese Erscheinung der Sättigung ist im Gehirn, in der Muskulatur und etwas weniger stark ausgeprägt auch in der Lunge und Niere zu beobachten.

Die Konzentration von gebundenem Polymyxin B in der Leber steigt mit zunehmender Dosierung auf Werte, die um das Doppelte höher liegen als in anderen Organen (CRAIG u. KUNIN, 1973).

Trotz hoher Konzentration im Gehirn und im Serum konnte Polymyxin B im Liquor cerebrospinalis nicht nachgewiesen werden (CRAIG u. KUNIN, 1973; WALTER u. HEILMEYER, 1975).

2.1.8.3. Ausscheidung von Polymyxin B

2.1.8.3.1. Ausscheidung über die Galle

Nach WALTER und HEILMEYER (1975) wird Polymyxin B nicht oder nur zu einem geringen Teil über die Galle ausgeschieden.

Selbst bei intravenöser Applikation können nur minimale Konzentrationen in der Galle erwartet werden.

BROWNLEE et al. (1952) konnten grundsätzlich keine Ausscheidung über die Galle feststellen.

2.1.8.3.2. Ausscheidung über die Niere

60% der verabreichten Polymyxin B-Menge werden innerhalb 3 - 4 Tagen über die Niere ausgeschieden. Im Urin können dabei Konzentrationen auftreten, die 20 - 30 mal höher als die Serumwerte sind (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Das im Urin ausgeschiedene Polymyxin B liegt zu einem geringen Prozentsatz (0,3%) in biologisch aktiver Form vor (BROWNLEE, 1952). Im Gegensatz dazu steht eine Produktinformation (Pomesul^R, Pfizer), nach der Polymyxin B in aktiver Form über die Niere ausgeschieden wird.

BAINES und RIFKIND (1964, zit. n. GARROD, 1978) gehen aufgrund ihrer Untersuchungen davon aus, daß der Serumspiegel im Rahmen der renalen Ausscheidung keinen Einfluß auf die Polymyxin B-Konzentration im Urin hat.

Zwei Stunden nach einer intravenösen Behandlung liegt die mittlere Harnkonzentration von Polymyxin B bei 100 - 200 µg/ml. Nach 8 Stunden können noch 15 - 45 µg/ml im Urin nachgewiesen werden. Zwölf Stunden nach einer Polymyxin B-Behandlung sind etwa 40% der verabreichten Mengen über die Niere ausgeschieden worden, nach 48 Stunden ca. 65% (Abb.4) (ZIV et al., 1982a).

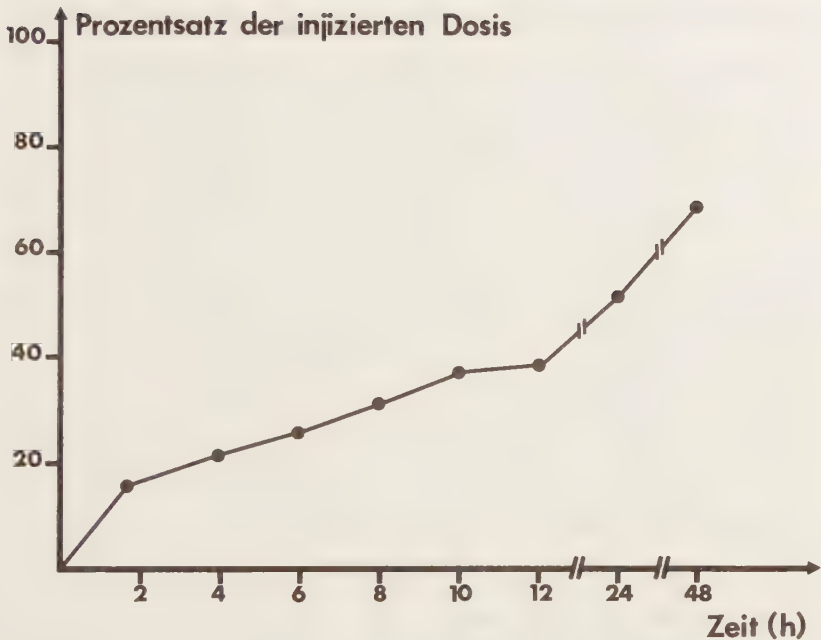


Abb. 4: Polymyxin B (in %) im Urin nach einer einmaligen intravenösen Injektion (ZIV et al., 1982a).

2.1.9. Nebenwirkungen

Relativ häufig auftretende Nebenerscheinungen lassen eine uneingeschränkte therapeutische Anwendung von Polymyxin B nicht ratsam erscheinen. Auch bei üblicher Dosierung und vor allem bei längerdauernder Verabreichung ist mit neurotoxischen und nephrotoxischen Nebenwirkungen zu rechnen (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

2.1.9.1. Neurotoxizität

Beim Menschen treten als häufigste Symptome einer Neurotoxizität Taubheit, Kribbelgefühle im Gesicht und an den Fingern, Schwindelanfälle, Kopfschmerzen, Lethargie und Reizbarkeit auf. Bei Ausscheidungsstörungen über die Niere können sogar Ataxien, Seh- und Sprachstörungen vorkommen (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

LINDESMITH et al. (zit. nach GARROD, 1968) berichten von einigen Patienten, bei denen nach einer Polymyxin B-Behandlung Atemnot auftrat. Dieser Effekt konnte bei Behandelten mit normaler Nierenfunktion, d.h. mit normlen Ausscheidungsverhältnissen, nicht beobachtet werden.

Bei 7,3% der mit Polymyxin B behandelten Personen treten neurotoxische Symptome auf. Respiratorische Nebenerscheinungen kommen in 2,1% der untersuchten Fälle vor (KOCH-WESER et al., zit. nach GARROD, 1978).

MORTON et al. (1949) erforschten die akute Toxizität von Polymyxin B in Abhängigkeit von Dosierung und Applikationsart. Bei intravenöser Injektion in einer Dosierung bis zu 15 mg/kg stellen sich beim Hund folgende Reaktionen ein: Pupillendilatation, Paralyse der Hintergliedmaßen, Ataxien und Juckreiz am Kopf. Bei einer Erhöhung der Dosis auf 25 mg/kg treten zusätzlich Konvulsionen und Atemnot auf. Nach 20 Minuten kommt es zum Tod der Tiere.

Bei einer intravenösen Dauertropfinfusion (0,25 mg/kg/min) sind die neurotoxischen Erscheinungen weniger ausgeprägt. Der Tod der Tiere tritt ein, wenn eine Gesamtdosis von

35 mg/kg erreicht ist. Mit geringeren neurotoxischen Nebenwirkungen ist bei einer intramuskulär verabreichten Dosis von bis zu 10 mg/kg zweimal täglich zu rechnen. Derartig dosiert, kann Polymyxin B über sieben Tage hinweg ohne allzu großes Risiko injiziert werden.

Bei Kälbern zeigen sich 2 - 4 Stunden nach einer einmaligen intramuskulären Injektion von 5 mg/kg Polymyxin B Ataxien, Lethargie und Appetitlosigkeit (ZIV et al., 1980a).

2.1.9.2. Nephrotoxizität

Die Nephrotoxizität macht sich als Albuminurie und Hämaturie bemerkbar. Eine Erhöhung des Reststickstoffes kommt nur bei länger dauernder Therapie und hoher Dosierung vor. Die Nebenerscheinungen gelten als reversibel und gutartig. Eine Normalisierung erfolgt meist eine Woche nach Absetzen des Medikaments.

Auftreten und Schwere der Nebenwirkung hängen von Nierenfunktionszustand, von der Tagesdosis (toxische Grenze 3 mg/kg/Tag) und der Therapiedauer (maximal 10 Tage) ab (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Nach subkutaner Injektion von 20 mg/kg Polymyxin B können bei Ratten zelluläre Bestandteile aus der Niere im Urin festgestellt werden. Desweiteren tritt Albuminurie auf und das spezifische Gewicht des Urins vermindert sich.

Histologische Untersuchungen der Niere von Mäusen, Hunden und Ratten, die mit Polymyxin B behandelt wurden, weisen umfangreiche Zerstörungen von Tubuluszellen auf (MORTON et al., 1949). Untersuchungen an Kaninchen von BROWNEE et al. (1952) ergaben dagegen, daß Polymyxin B nur in geringem Maße nephrotoxisch wirkt. Renale Zellen wurden nicht oder nur gelegentlich im Urin von behandelten Tieren gefunden. Der Anstieg der Proteine im Urin war nicht signifikant. Histologisch konnte an einigen wenigen Nierentubuluszellen eine schwache, trübe Schwellung beobachtet werden.

Nach VINNICOMBE und STARNNEY (1969; zit. n. GARROD, 1978) ist die Nierenfunktion beim Hund nach Polymyxin B-Anwendung deutlich beeinträchtigt. Durch eine einmalige intravenöse Gabe von 5 mg/kg wird die glomeruläre Filtrationsrate und der renale Plasmafluß um etwa 60% reduziert. Im Unterschied dazu erbrachten die Ergebnisse von ZIV et al. (1980a) keinen ausschlaggebenden Anstieg der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Plasmaflusses beim Kalb. ZIV wählte für seine Versuche ebenfalls eine Dosis von 5 mg/kg, die er intravenös injizierte.

2.1.9.3. Lokale Nebenwirkungen

Die intramuskuläre Injektion von Polymyxin B ist schmerzhaft und führt zu lokalen Gewebeschäden (GARROD, 1978).

An der Injektionsstelle kommt es zu entzündlichen und ödematösen Veränderungen.

Bei der histologischen Untersuchung werden schwere Zellschädigungen, leukozytäre Infiltration und fibrinöses Exsudat sichtbar (BROWNLEE, 1952).

2.1.9.4. Allergische Nebenwirkungen

Allergische Reaktionen wie Urtikaria, Fieberreaktionen, generalisierter Juckreiz und Eosinophilie sind selten und dann leichter Natur (WALTER u. HEILMEYER, 1975; FORTH et al., 1980).

2.1.10. Indikation und Anwendung

Bei der Anwendung von Polymyxin B sind nach WALTER und HEILMEYER (1975) vier Gegebenheiten zu berücksichtigen:

1. Die Wirksamkeit ist nur auf einige gramnegative Keime beschränkt.
2. Die neuro- und nephrotoxische Nebenwirkung.
3. Die geringe Diffusionsfähigkeit in das Gewebe.
4. Das Auftreten von 5 - 20% primärer resistenter *Pseudomonas aeruginosa*-Stämme.

Bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterobacter* gilt Polymyxin B dennoch als Mittel der Wahl.

Bei Organinfektionen ist vor allem die Harnwegentzündung, die mit Polymyxin B erfolgreich behandelt werden kann, als Indikation anzusehen. Pneumonie, Endocarditis, Meningitis und Sepsis sind für die Polymyxin B-Therapie nicht geeignet, da für eine erfolgreiche Behandlung ein ausreichend

guter Kontakt zwischen Antibiotika und Krankheitserreger als Voraussetzung gilt.

Diese Bedingung ist nur bei Harnwegsinfektionen erfüllt, da bei den anderen Organinfekten die erreichbaren Serumkonzentrationen und das geringe Diffusionsvermögen diesen Kontakt nicht gewährleisten.

Ist aufgrund der Resistenzlage (Unwirksamkeit anderer in Frage kommender Antibiotika) dennoch ein Polymyxin B-Einsatz indiziert, muß die Behandlung mit maximaler Dosierung und wenn möglich mit einer lokalen Instillation durchgeführt werden (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Seitdem Gentamycin und Carbenicillin als Antibiotika in Gebrauch sind, gilt Polymyxin B bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa* und coliformen Keimen nicht mehr als Mittel der Wahl. Es wird jedoch immer noch mit gutem Erfolg in Form von Puder, Spray oder Salben bei der örtlichen Behandlung von Wunden und Otitis externa eingesetzt (GARROD, 1978).

Obwohl MORTON et al. (1949) in ihren Versuchen gute in vivo- und in vitro-Wirksamkeit von Polymyxin B gegenüber *Haemophilus influenzae* nachweisen konnten, wird die Behandlung einer *Haemophilus influenzae*-Infektion mit Polymyxin B von LINZENMEIER (1972) nicht mehr empfohlen.

Nach LINZENMEIER (1972) ist von Polymyxin B nur bei Infektionen durch *E. coli*, Klebsiellen, *Pseudomonas aeruginosa*, Salmonellen und Shigellen ein therapeutisch nutzbarer antibakterieller Effekt zu erwarten.

2.1.11. Intramammäre Applikation

Bei einer Instillation von 1.000.000 I.E. Polymyxin B in ein gesundes Euterviertel erhielten ZIV et al. (1982b) 12 Stunden nach der Behandlung eine Polymyxin B-Konzentration in der Milch von etwa 200 - 550 I.E./ml. Die zu den Versuchen herangezogenen Milchkühe erzielten eine tägliche Milchleistung von 8 - 16 Liter; die Tiere hatten das Stadium der Hochlaktation bereits überschritten. Sieben Melkzeiten nach der intramammären Instillation konnte noch Polymyxin B in der Milch festgestellt werden. Entsprechend dem Konzentrationsabfall in der Milch ergab sich eine mittlere Halbwertszeit von 12 Stunden. Bei einer Instillation von Polymyxin B (1.600.000 I.E.) in gesunde und akut entzündete Euterviertel zeigten sich signifikante Unterschiede. Wie dargestellt, war die festgestellte Konzentration in der Milch von gesunden Eutervierteln vier Stunden nach einer Behandlung (1055 I.E.) deutlich höher als diese von akut entzündeten Eutervierteln (615 I.E.) (Abb. 5).

Der Rückgang der Polymyxin B-Konzentration im Sekret von akut entzündeten Eutervierteln während der ersten 12 Stunden nach einer Behandlung war annähernd dreimal größer als in der Milch von gesunden Eutern.

Im Serum der mit Polymyxin B behandelten Kühe konnte kein Polymyxin B ausgemacht werden, wenn keine Entzündung am behandelten Euter vorhanden war.

War jedoch eine akute Euterentzündung bei einem Tier diagnostizierbar, konnte nach einer intramammären Instillation

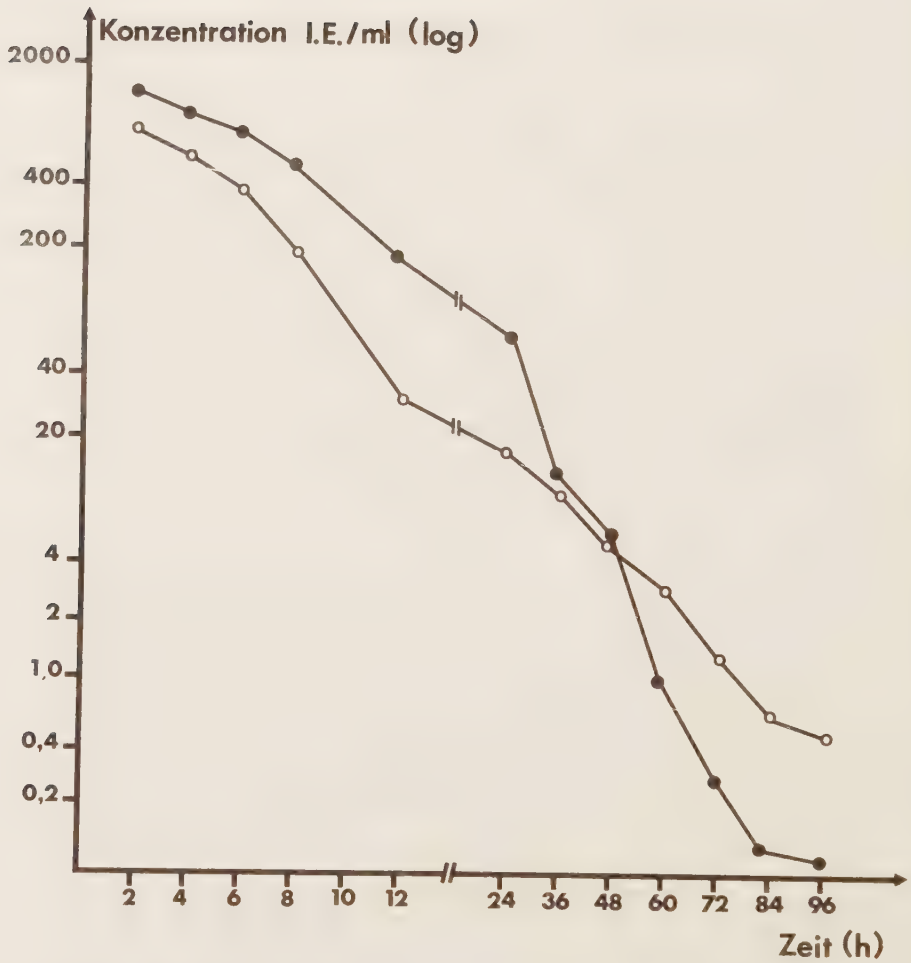


Abb. 5: Konzentration von Polymyxin B (1.600.000 I.E./Viertel) in normalen und akut entzündeten Eutervierteln (● : normal, ○ : entzündet) (ZIV et al., 1982b).

Polymyxin B im Blut, das aus der Vena subcutanea abdominalis genommen wurde, nachgewiesen werden. (Abb. 6). Blutproben aus der Vena jugularis waren bei denselben Tieren frei von Polymyxin B.

Im Urin von gesunden Kühen, die intramammär mit Polymyxin B behandelt wurden, fand man kein Polymyxin B.

Andere Verhältnisse lagen bei an akuter Mastitis erkrankten Tieren vor. Bei diesen Kühen konnte Polymyxin B im Urin in einer Größenordnung von 100 I.E./ml nachgewiesen werden (ZIV u. SCHULTZE, 1982 b).

Im allgemeinen wird zur lokalen Therapie einer coliformen Mastitis Polymyxin B wegen seiner geringen Resistenz-Quote als Mittel der Wahl empfohlen (SIDDQUE et al., 1965; AHLERS et al., 1979). Doch leider liegen bisher noch keine exakten Angaben über den klinischen Einsatz von Polymyxin B vor (ZIV, 1980b). ZIV et al. (1978) fanden bei ihren Untersuchungen, daß 50 µg/ml Polymyxin B ausreichen, um 5 ng/ml Endotoxin von E.coli zu neutralisieren. Sie sind der Meinung, daß mit einer entsprechend hohen Dosis Polymyxin B ein genügend hoher Wirkstoffspiegel im Euter erreicht werden kann, um die bei einer coliformen Mastitis auftretenden Endotoxine zu neutralisieren. ZIV und SCHULTZE (1983) applizierten E. coli-Endotoxin (1 mg/Euterviertel) in Euter von gesunden Tieren und konnten dadurch das klinische Bild einer akuten Mastitis hervorrufen. Durch eine intramammäre Polymyxin B-Instillation (1.600.000 I.E./Viertel) wurden kli-

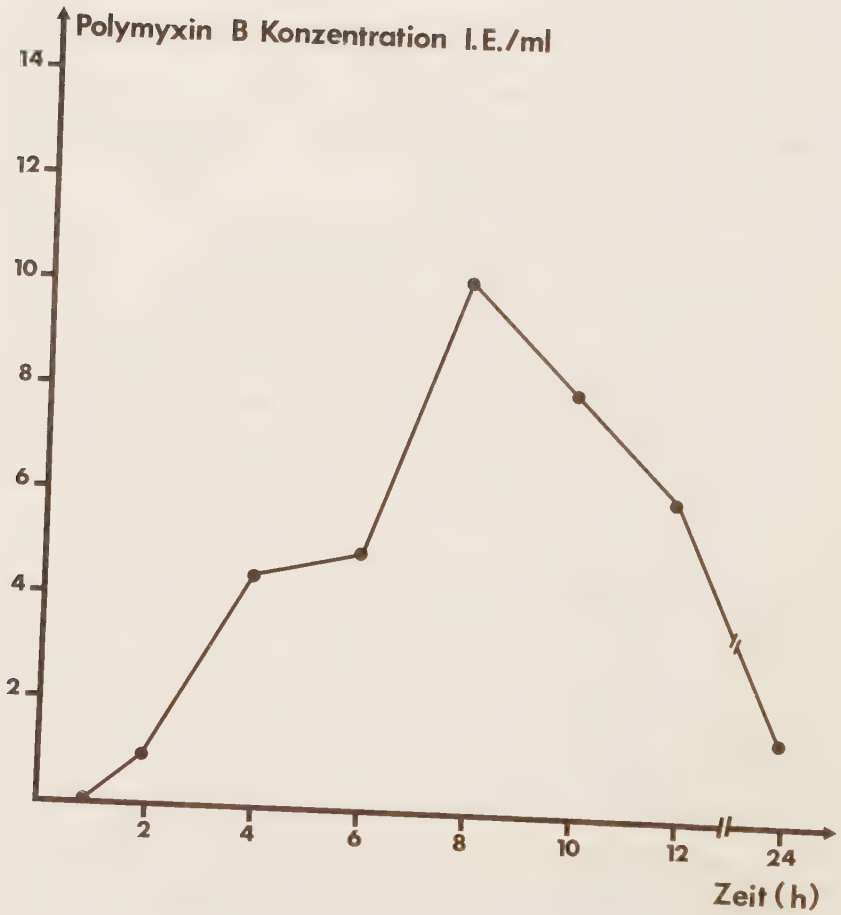


Abb. 6: Konzentration von Polymyxin B im Blut aus der Vena abdominalis von Kühen mit akuter Mastitis (ZIV et al., 1982b).

nisch-pathologische Veränderungen nur dann verhindert, wenn Polymyxin B 30 Minuten vor, oder gleichzeitig mit dem Endotoxin appliziert wurde. Eine Polymyxin B-Behandlung 30 Minuten nach der Endotoxin-Verabreichung hatte keinen therapeutischen Einfluß auf die ausgeprägten Entzündungserscheinungen.

ZIV (1980b) empfiehlt nach einer persönlichen Mitteilung von HEITMANN (Chassot Pharma, Köniz, Schweiz) für die intramammäre Instillation eine Dosis von 100 mg Polymyxin B pro Euterviertel. Diese Dosis scheint bei möglichst frühzeitiger Anwendung den Krankheitsverlauf einer coliformen Mastitis günstig zu beeinflussen.

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1. Allgemeines

Um möglichst schnell eine repräsentative Anzahl von zu untersuchenden Milchproben zu bekommen, wurden sieben Tierärzte, die im Regierungsbezirk Schwaben (Landkreis Augsburg und Günzburg) als Großtierpraktiker tätig sind, um Mithilfe gebeten. Diese Kollegen nahmen im Zeitraum von März bis Oktober 1983 334 geeignete Milchproben.

Die landwirtschaftliche Struktur in dieser Gegend weist zum größten Teil Grünland aus. Kartoffeln und Getreide mit Raps oder Klee als Zwischenfrucht werden zu einem geringen Teil angebaut. Der Anbau von Mais ist noch relativ wenig verbreitet, zeigt aber in letzter Zeit eine zunehmende Tendenz. Die Anzahl der Milchkühe pro Betrieb liegt nur in seltenen Fällen über 25 Stück. Bis auf einzelne Ausnahmen handelt es sich also um Klein- bis Mittelbetriebe.

Der überwiegende Anteil der Milchviehpopulation besteht aus Fleckviehkühen. Rotbunte und Schwarzbunte sowie Braunvieh und andere Rassen treten anteilmäßig deutlich in den Hintergrund.

Nur noch wenige Landwirte geben der Weidehaltung gegenüber der ganzjährigen Stallhaltung den Vorzug. Die Fütterung besteht aus Wiesengras, Heu, Silage (Gras und Mais), Raps, Klee, Kraft- und Mineralfuttermischungen. Die Stallhygiene

gibt nur in manchen Fällen Anlaß zur Kritik und ist als gut bis überdurchschnittlich gut zu bezeichnen.

3.2. Material

Zur Untersuchung kamen Milchproben von Kühen, die an akuter Mastitis erkrankt waren. Als Anhaltspunkte für die Erkennung einer akuten Mastitis gelten die von WALSER et al. (1972) beschriebenen klinischen Symptome. Pathognostisch für eine akute Mastitis ist ein pathologischer Befund am Euter (vermehrte Wärme, Schmerzhaftigkeit, Rötung, Schwellung und gestörte Funktion) im Zusammenhang mit einem gestörten Allgemeinbefinden (Fieber, Inappetenz).

Krankheitssymptome wie Enteritis, Arthritis und Festliegen sind seltene Befunde beim Vorliegen einer akuten Mastitis. Die Veränderungen der Milch sind sehr vielgestaltig und lassen für sich allein gesehen nur in begrenztem Maße die Charakterisierung einer Mastitis zu. Im allgemeinen zeigt die Milch starke Veränderungen. Das Sekret ist wässrig, serumähnlich oder blutig-serös, zum Teil mit Gerinnseln und Flocken durchsetzt. Der Milchcharakter ist in allen fortgeschrittenen Fällen verloren.

Die Milchproben wurden möglichst steril in Anlehnung an die von DIERNHOFER (1950) empfohlene Methode entnommen und wöchentlich zur Untersuchung an die Gynäkologische Tierklinik nach München gebracht. Bis zur Untersuchung war eine Aufbewahrung der verschlossenen Proben bei Kühlschranktemperatur (+4°C) gewährleistet.

3.3. Methodik

3.3.1. Bakteriologische Untersuchung

3.3.1.1. Anreicherung und Isolierung

In der Gynäkologischen Tierklinik München wurden die Milchproben bakteriologisch untersucht. Als Nährboden kam ein Blutagar zur Verwendung:

Zusammensetzung des Blutagars (g/Liter):

33 Tryptose-Blood-Agar-Base (DIFCO)

1 Aeskulin

1000 ml Aqua dest

dazu 7% gewaschene Rindererythrozyten.

Eine Öse der zu untersuchenden Milch wurde im fortlaufenden Ausstrichverfahren auf ein Viertel einer Blutagarplatte ausgestrichen. Pro Blutagarplatte konnten somit vier Milchproben untersucht werden. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C erfolgte die Beurteilung. Die Erkennung der coliformen Keime ist anhand der Kulturmorphologie möglich. Coliforme Keime wachsen in mittelgroßen, undurchsichtigen, weißen bis hellgrauen, glatten, glänzenden, manchmal schleimig-schmierig aussehenden Kolonien, die eine gewölbte oder flache Oberfläche haben. Das Wachstum ist meist üppig. Den Kolonien haftet ein muffiger, urinöser Geruch an. Bei manchen Serotypen tritt eine schmale Hämolysezone auf (ROLLE u. MAYER, 1984).

Bei zweifelhaftem Wachstum war durch die Färbung nach Gram eine Zuordnung möglich. Gramgefärbte coliforme Keime stellten sich im mikroskopischen Bild als gramnegative, kurze, plumpe Stäbchen mit abgerundeten Enden dar.

3.3.1.2. Resistenzbestimmung

Die isolierten coliformen Keime wurden anschließend einer Resistenzbestimmung im Agar-Diffusionsverfahren mit Testringen (Mast-Diagnostica, Hamburg) unterworfen. Tabelle 5 zeigt die getesteten Antibiotika, ihre Dosis und die Beurteilungskriterien.

Von der Blutagar-Platte wurde eine isoliert liegende Keimkolonie mit einer Öse entnommen und in etwa 3 - 5 ml Nährbouillon (Standard II, Merck) suspendiert. Nach guter Durchmischung erfolgte mittels eines Wattetupfers der Ausstrich dieser Keimsuspension auf einer ASS-Agar-Platte (Antibiotika-Sulfonamid-Sensibilitätstest-Agar, Merck, Art.Nr. 5392). Um einen möglichst dichten Keimrasen zu bekommen, muß die Keimsuspension gleichmäßig auf der ganzen Platte verteilt werden. Es empfiehlt sich deshalb, die Platte insgesamt viermal in der fortlaufenden Ausstrichmethode auszustreichen, wobei nach jedem Ausstrich die Platte um 90° gedreht werden soll. Die beimpften Platten wurden anschließend mit den Antibiotika-Testringen versehen. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C konnte die Auswertung erfolgen.

Tab. 5: Getestete Antibiotika, Beurteilungskriterien, Dosis
(Mast-Diagnostica, Hamburg)

Chemotherapeutikum	Dosis ($\mu\text{g}/\text{Tabl.}$)	Hemmhofdurchmesser	
		$\geq \text{mm}$ resistent	$\leq \text{mm}$ empfindlich
Ampicillin	10	14	19
Penicillin G	6	29	29
Gentamycin	10	15	18
Erythromycin	15	17	21
Tetracyclin	30	17	22
Nitrofurantoin	100	11	16
Chloramphenicol	30	21	21
Cotrimoxazol	25	10	16
Polymyxin B	30	8	12
Oxacillin	5	16	16
Streptomycin	10	11	15
Neomycin	30	12	17
Spectinomycin	10	7	7
Lincomycin	15	19	24
Sulfamethizol	300	12	17

3.3.1.3. Differenzierung der coliformen Keime

Zur weiteren Differenzierung der coliformen Keime wurde Endo-C-Agar (Merck, Art. Nr. 4044) verwendet. Endo-C-Agar entspricht den Standard Methods for the examination of Dairy Products (1967).

Zusammensetzung des Endo-C-Agars (g/Liter):

10,0 Pepton aus Fleisch

3,5 di-Kaliumhydrogenphosphat

10,0 Lactose

2,5 Natriumsulfit, wasserfrei

0,4 Fuchsin

12,5 Agar-Agar

1000 Aqua dest.

Die Wirkungsweise des Endo-C-Agars beruht darauf, daß Natriumsulfit und Fuchsin das Wachstum grampositiver Bakterien hemmen. E.coli und auch coliforme Keime verwerten Lactose unter Bildung von Aldehyd und Säure, Aldehyd wiederum setzt Fuchsin aus der Fuchsin-Sulfit-Verbindung frei, das dann die Kolonie rot färbt. Bei E.coli ist diese Reaktion so intensiv, daß Fuchsin auskristallisiert und dadurch den Kolonien einen grünschimmernden, beständigen Metallglanz (Fuchsin-
glanz) verleiht. Eine Differenzierung von E.coli ist auf diese Weise mit hinreichender Sicherheit gewährleistet.

Durch Sauerstoffeinwirkung wird der ausgegossene Nährboden infolge Oxidation des Sulfits allmählich rot und damit un-

brauchbar. Selbst bei Dunkelheit und Kühlschranktemperatur ist er nur wenige Tage haltbar.

Von der Blutagar-Platte wurde eine einzelne typische Kolonie auf Endo-C-Agar überimpft. Nach einer Bebrütungszeit von 24 Stunden bei 37°C konnte durch den charakteristischen Metallglanz E.coli ohne Schwierigkeiten von anderen coliformen Keimen unterschieden werden.

3.3.2. Die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration im Agar-Verdünnungs-Verfahren

3.3.2.1. Allgemeines

Die Durchführung der Versuche geschah nach einer Norm, die in Zusammenarbeit mit der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie vom Arbeitsausschuß "chemotherapeutische Untersuchungsmethoden" des Normenausschusses Medizin (Na Med) im Deutschen Institut für Normung e.V. (DIN) erarbeitet wurde (DIN 58940 Teil 6).

Diese Norm hat ihre Gültigkeit nur für schnellwachsende bakterielle Krankheitserreger (außer Mykobakterien). Sie enthält Anleitungen zur Durchführung der Agar-Verdünnungsmethode, um größtmögliche Sicherheit, Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit bei Festlegung der minimalen Hemmkonzentration zu erzielen. Die Agar-Verdünnungsmethode dient zur Feststellung der minimalen Hemmkonzentration auf einem Agar-Medium mit abgestuften Wirkstoffkonzentrationen. Zur Herstellung der Agar-Platten wird das Agar-Medium mit Ver-

dünnungen einer wirkstoffhaltigen Stammlösung gemischt. Anschließend beimpft man die Platten mit dem Testkeim. Die Auswertung kann direkt nach der Bebrütung vorgenommen werden. Man bestimmt die Agar-Platte mit der niedrigsten Wirkstoffkonzentration, auf der kein Wachstum stattfindet. Die Wirkstoffkonzentration dieser Platte entspricht der minimalen Hemmkonzentration.

3.3.2.2. Herstellung der Stammlösung

Für die Herstellung der Stammlösung wurde Polymyxin B in Reinsubstanz verwendet. Als Lösungsmittel für den Wirkstoff diente steriles Aqua dest. Da sich Polymyxin B gut in Wasser löst, mußte kein Lösungsvermittler zugesetzt werden.

Um eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ zu bekommen, wiegt man 200 mg (200.000 μg) Polymyxin B ab und löst es durch beständiges Schütteln in 100 ml Aqua dest. auf.

3.3.2.3. Herstellung der Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe besteht aus Verdünnungsschritten, wobei die Konzentration des Wirkstoffes in der nachfolgenden Stufe jeweils um die Hälfte reduziert ist. Die Konzentrationen der einzelnen Stufen haben die Werte der Exponentialreihe mit ganzen Exponenten für die Grundzahl 2. Zur Herstellung der Verdünnungsreihe werden 64 ml der Stammlösung mit der Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ mit 36 ml sterilem Aqua dest. gemischt. Die dadurch erreichte Lösung hat eine Konzentration

von 1280 $\mu\text{g/ml}$. Von dieser Lösung werden 20 ml mit 20 ml H_2O , 10 ml mit 30 ml H_2O und nochmals 10 ml mit 70 ml H_2O verdünnt. Man erhält dadurch 40 ml einer Verdünnung mit einer Konzentration von 640 $\mu\text{g/ml}$, nochmals 40 ml mit einer Konzentration von 320 $\mu\text{g/ml}$ und 80 ml mit einer Konzentration von 160 $\mu\text{g/ml}$.

Von den 80 ml der Lösung mit der Konzentration von 160 $\mu\text{g/ml}$ vermischt man wiederum 20, 10 und 10 ml mit 20, bzw. 30 bzw. 70 ml H_2O . Die aus diesen Verdünnungsstufen erreichten Mengen und Konzentrationen sind 40 ml Verdünnung mit 80 $\mu\text{g/ml}$, bzw. 40 ml Verdünnung mit 40 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 80 ml mit 20 $\mu\text{g/ml}$.

Die Lösung mit der Wirkstoffkonzentration von 20 $\mu\text{g/ml}$ wird wiederum als Ausgangslösung für die nächsten 3 Verdünnungsstufen herangezogen. Auf diese Weise erhält man Verdünnungen, deren Konzentrationen jeweils um die Hälfte abnehmen (Tab. 6).

Für die Versuche werden 13 Verdünnungsstufen mit folgenden Polymyxin B-Konzentrationen benötigt. 1280 $\mu\text{g/ml}$; 640 $\mu\text{g/ml}$; 320 $\mu\text{g/ml}$; 160 $\mu\text{g/ml}$; 80 $\mu\text{g/ml}$; 40 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$; 10 $\mu\text{g/ml}$; 5 $\mu\text{g/ml}$; 2,5 $\mu\text{g/ml}$; 1,25 $\mu\text{g/ml}$; 0,625 $\mu\text{g/ml}$; 0,3125 $\mu\text{g/ml}$.

Die hergestellten Lösungen wurden portioniert, in gut verschlossenen Glaskolben bei -12°C eingefroren und bei Bedarf in einem Wasserbad bei $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ wieder aufgetaut.

Tab. 6: Anleitung zur Herstellung der Stammlösung und der Verdünnungsreihe.

Mischung			Gesamt- menge Volumen- teile	Erreichte Konzentr. $\mu\text{g/ml}$	Konzentr. nach Zugabe von 9 Vol.-% Teilen Agar -Medium $\mu\text{g/ml}$	$\log_2 x$
Konzentra- tion $\mu\text{g/ml}$	Wirkstoff					
	Menge Volumen- teile	Aqua dest. Volumen- teile				
2000	6,4	3,6	10	1280	128	7
1280	2	2	4	640	64	6
1280	1	3	4	320	32	5
1280	1	7	8	160	16	4
160	2	2	4	80	8	3
160	1	3	4	40	4	2
usw.						

3.3.2.4. Herstellung der Agar-Platten

Zur Herstellung der Agar-Platten wurde 1 Teil Verdünnung jeder Verdünnungsstufe mit jeweils 9 Teilen Agar-Medium gemischt und diese Mischung in Petrischalen ausgegossen.

Als Agar-Medium wurde gemäß der DIN-Vorschrift Mueller-Hinton-Medium verwendet.

Zusammensetzung des Mueller-Hinton-Agars (g/Liter):

5,0 Fleischinfus.

17,5 Caseinhydrolysat

1,5 Stärke

12,5 Agar-Agar

36,5 g des Trockenpulvers wurden in 1000 ml H₂O gelöst und schonend autoklaviert (10 min bei 115°C).

Aus arbeitstechnischen Gründen wurde der Agar in größeren Mengen hergestellt, portioniert und bis zur Verwendung und Weiterbearbeitung in Glaskolben bei Kühlschranktemperatur (+4°C) gelagert.

Die fertigen Agar-Platten konnten nicht im Vorrat gegossen werden, da nach DIN-Vorschriften bei Referenzuntersuchungen die wirkstoffhaltigen Agar-Platten nur 24 Stunden bei einer Temperatur von 4°C aufbewahrt werden dürfen.

Der Mueller-Hinton Agar wurde im Dampfkessel bei 100°C bis zur völligen Auflösung erwärmt, in einem vorbereiteten Wasserbad auf $50 \pm 2^\circ\text{C}$ abgekühlt und bei dieser Temperatur flüssig gehalten. Nun wurde dem Agar-Medium 7% defibrinisiertes Blut eingemischt.

Das Blut stammte von gesunden und unbehandelten Kühen aus der Gynäkologischen Tierklinik in München. Unter möglichst sterilen Kautelen (steriles Blutentnahmebesteck, gute Fixation des Spendertieres, Desinfektion der Punktionsstelle) wurde in eine Infusionsflasche, die zu $1/3$ mit Glasperlen gefüllt war, die benötigte Menge Blut abgenommen. Bereits während der Blutentnahme mußte die Flasche in einer rotierenden Bewegung geschüttelt werden. Danach wurde noch einmal 10 Minuten kräftig geschüttelt, so daß durch die Glasperlen eine vollständige Defibrinierung des Blutes gewährleistet war.

15 - 30 Minuten lang wurde anschließend das Blut im Kühlschrank abgekühlt. Die entsprechende Menge Blut konnte nun dem $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$ warmen Mueller-Hinton-Agar unter Rühren zugesetzt werden.

Die Verdünnung jeder Verdünnungsstufe wurde nun im Verhältnis 1:9 mit dem flüssigen Mueller-Hinton-Agar in einen Glaskolben gegeben und gleichmäßig vermischt. Dies geschah alles im Wasserbad bei $50 \pm 2^{\circ}\text{C}$, um eine vorzeitige Erstarrung des Agars zu verhindern. Für den Ausguß einer Petrischale wurden 20 ml wirkstoffhaltiger Agar berechnet. Bei den mit einem Innendurchmesser von 90 mm als Sollmaß verwendeten Petrischalen ergab dies eine Agarschichtdicke von 3,5 mm.

Vor dem Erstarren des Agars wurden die ausgegossenen Platten mit dem Bunsenbrenner abgeflammt, um die entstandenen Luftblasen zu zerstören und um eine möglichst sterile Agaroberfläche zu bekommen.

Da die Verdünnungen jeder Verdünnungsstufe mit dem Agar-Medium in einem Verhältnis von 1:9 gemischt wurden, war in den fertigen Agar-Platten eine Endkonzentration, die 1/10 kleiner war als die Wirkstoffkonzentration der jeweiligen Verdünnung (Tab. 6).

Die 13 fertigen Agar-Platten hatten demnach folgende Polymyxin B-Konzentrationen:

1) 128 µg/ml; 2) 64 µg/ml; 3) 32 µg/ml; 4) 16 µg/ml; 5) 8 µg/ml; 6) 4 µg/ml; 7) 2 µg/ml; 8) 1 µg/ml; 9) 0,5 µg/ml; 10) 0,25 µg/ml; 11) 0,125 µg/ml; 12) 0,0625 µg/ml; 13) 0,03125 µg/ml.

3.3.2.5. Beimpfen der Agar-Platten

Mit einer Bakteriensuspension, die 10^7 vermehrungsfähige Keime enthält, sind die Testplatten so zu beimpfen, daß auf eine Fläche von $0,5 \text{ cm}^2$ etwa 10^4 Keime kommen. Auf einer Platte können gleichzeitig mehrere Stämme untersucht werden, wobei jedoch mindestens ein Stamm mit bekannter Empfindlichkeit als Kontrolle dabei sein muß. Die Bebrütungsdauer beträgt 16 - 20 Stunden bei $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

3.3.2.5.1. Einstellen der Keimzahl

Die bei Kühlschranktemperatur ($+4^\circ\text{C}$) auf Blutagar aufbewahrten Kulturen wurden auf Endoplaten überimpft. Dazu wurden mit einer Öse 3 - 4 typische, einzelliegende Kolonien erfaßt und gleichmäßig auf der vorbereiteten Endoplatte ausgestrichen. Die Bebrütung erfolgte etwa 18 ± 2 Stunden bei einer Temperatur von $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

Nach dieser Bebrütungszeit wurden die Platten mit den angezüchteten Kolonien mit etwa 4 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung abgeschwemmt.

Um eine gute Suspendierung der Keime zu erreichen, war es notwendig, die Kolonien vorsichtig mit einem Glasspatel aufzurühren. Etwa 3 ml dieser Keimsuspension konnten durch Abpipettieren in ein Reagenzglas verbracht werden.

Mit dieser Keimsuspension mußte nun eine Zehner-Verdünnung hergestellt werden. Dazu benötigte man 9 Reagenzgläser, die mit 0,9 ml physiologischer Kochsalzlösung gefüllt waren.

Von der Keimsuspension ausgehend wurden jeweils 0,1 ml in das folgende Reagenzglas überpipettiert. 0,1 ml Lösung aus dem letzten Reagenzglas wurden verworfen. Nach jeder erneuten Einpipettierung von 0,1 ml der vorhergehenden Keimsuspension, mußte für eine gründliche Durchmischung gesorgt werden. Um Verfälschungen vorzubeugen, wurde nach jedem Pipettieren eine neue sterile Pipette benutzt.

Nach diesem Arbeitsgang waren also 9 Verdünnungen mit einer Verdünnungsstufe von 10^{-1} bis 10^{-9} hergestellt.

Aus jeder Verdünnung mußten nun 0,1 ml auf eine Endoplatte pipettiert werden und mit einem Glasspatel sorgfältig und gleichmäßig auf der gesamten Fläche verteilt werden. Nach jedem Gebrauch wurde der Glasspatel in Spiritus getaucht und abgeflammt. Nach einer Bebrütung von 20 Stunden bei 36°C konnten die Platten ausgewertet werden. Die Auswertung geschah nach folgendem Schema:

Bei dieser Methode der Keimzahlbestimmung geht man davon aus, daß jeder vermehrungsfähige Keim eine Kolonie bildet.

Zur Zählung der Kolonien wählt man sich die Platte aus, bei der die Zahl der einzeln liegenden Kolonien zwischen 10 und 100 beträgt. Die Anzahl der Kolonien multipliziert man mit 10 und erhält die Zahl der Keime pro ml, die sich in der zugehörigen Verdünnung befinden. Der Faktor 10 erklärt sich dadurch, daß aus der Verdünnung nur 0,1 ml auf die Endplatte ausgestrichen wurden, die Keimzahl jedoch pro ml und nicht pro 0,1 ml angegeben wird. Anhand der Verdünnungsstufe und der nun bekannten Keimzahl dieser Verdünnung läßt sich die Keimkonzentration der Ausgangssuspension ermitteln.

Ein Beispiel zur Erläuterung:

Auf der Endplatte, die mit 0,1 ml der Verdünnung mit der Verdünnungsstufe 10^{-6} beimpft wurde, können 30 Kolonien gezählt werden. Das heißt, daß sich in der Verdünnung von 10^{-6} 30×10 (= 300) Keime pro ml befinden. Da die Ausgangssuspension bis zu dieser Verdünnungsstufe um das 10^6 -fache verdünnt wurde, sind in der Ausgangssuspension 300×10^6 (= 30×10^7) Keime pro ml. Nach einer entsprechenden Zugabe von Aqua dest. erhält man eine Bakteriensuspension, die eine Keimzahl von 10^7 pro ml hat und zur Beimpfung der Agar-Platten geeignet ist.

3.3.2.5.2. Ausstreichen des Inokulums

Nach der DIN-Vorschrift 58940 muß das Inokulum so ausgestrichen werden, daß eine Keimdichte von 10^4 pro $0,5 \text{ cm}^2$ entsteht.

Zur Beimpfung der Agar-Platten wurde eine Öse, die etwa $0,01 \text{ ml}$ Flüssigkeit aufnimmt, benutzt. Aus einem Inokulum, das eine Keimkonzentration von 10^7 Keimen pro ml hat, erfaßt diese Öse etwa 10^5 Keime. Um die benötigte Keimdichte von 10^4 pro $0,5 \text{ cm}^2$ zu erreichen, wurde das Inokulum auf einer Fläche von 5 cm^2 ausgestrichen.

Um eine möglichst gute Ausnutzung der Fläche einer Testplatte zu erlangen, war es sinnvoll, die 5 cm^2 als Kreisfläche mit einem Radius von $1,27 \text{ cm}$ darzustellen. Durch eine geeignete Anordnung (1 Kreis im Zentrum und 5 Kreise peripher gruppiert) konnten 6 Stämme auf einer Platte ausgestrichen werden. Die Größe und die Anordnung der Kreise wurden mit Hilfe einer Schablone auf den Boden der Petrischale aufgezeichnet. Auf jeder Platte wurden 5 Teststämme und ein Kontrollstamm (*E.coli* DSM 1103) mit bekannter Empfindlichkeit untersucht. Nach der Beimpfung wurden die Agar-Platten für 16 - 20 Stunden in einen Brutschrank verbracht, der auf eine Temperatur von $36 \pm 1^\circ\text{C}$ eingestellt war.

3.3.2.6. Auswertung und statistische Berechnung

Nach DIN-Vorschrift ist die minimale Hemmkonzentration die niedrigste Wirkstoffkonzentration, die auf einer Agar-Platte ein makroskopisch sichtbares Wachstum des Inokulums verhindert.

Für jeden Teststamm wurde die Agar-Platte mit der niedrigsten Wirkstoffkonzentration, auf der kein Wachstum feststellbar war, herausgesucht. Die minimale Hemmkonzentration für diesen Stamm ist die Wirkstoffkonzentration dieser Platte.

Kaum sichtbares Wachstum oder nur wenige Einzelkolonien wurden nicht als Wachstum interpretiert. In den meisten Fällen gab es jedoch keine Schwierigkeiten bei der Auswertung, da das Wachstum bei Unterschreiten der minimalen Hemmkonzentration in der Regel schlagartig und in üppiger Weise einsetzte.

Bei der Auswertung wurden folgende Daten festgehalten:

- Tagebuchnummer des Teststammes
- Kontrollstamm
- Durchgeführte Verdünnung
- Festgestellte MHK.

Zur statistischen Beurteilung der Ergebnisse wurde der Medianwert und der Modalwert verwendet.

Der Medianwert ist derjenige Wert, bei dem höchstens die Hälfte der Beobachtungen kleiner und höchstens die Hälfte größer ist. Bei einer ungeraden Anzahl von Beobachtungen ist es gerade der mittelste Wert. Bei einer geraden Anzahl nimmt man die Mitte zwischen den beiden mittelsten Werten.

$$\begin{array}{ll} \text{n: ungerade: } X_M = x_{\left(\frac{M+1}{2}\right)} & \text{n: gerade: } X_M = \frac{x_{\left(\frac{M}{2}\right)} + x_{\left(\frac{M+2}{2}\right)}}{2} \end{array}$$

Unter Modalwert (= häufigster Wert) versteht man denjenigen Wert, bei dem die dichteste Konzentration von Beobachtungen vorkommt (WALTER, 1975).

4. UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE

4.1. Häufigkeit der coliformen Keime

Die Anzahl der bakteriologisch untersuchten Milchproben, die von Kühen mit akuter Mastitis stammten, belief sich auf 334. 141 Proben enthielten coliforme Keime. Der prozentuale Anteil von coliformen Keimen betrug hiermit 42,2%.

4.2. Häufigkeit von E.coli

Durch die Differenzierung mittels Endo-C-Agar konnten 122 dieser Stämme als E.coli-Stämme identifiziert werden. Die restlichen 19 coliformen Keime wurden ohne weitere Differenzierung in den folgenden Versuchen mituntersucht. Der prozentuale Anteil von E.coli an allen coliformen Keimen betrug 86,5%.

4.3. Ergebnis des Resistenztestes

Das Ergebnis des Resistenztestes ist in Tabelle 7 dargestellt.

Zum Resistenztest standen alle 141 isolierten coliformen Keime zur Verfügung.

Gegenüber Polymyxin B waren zwei Stämme resistent (Tagebuch-Nr. 600 und 432).

Der Stamm mit der Tagebuch-Nr. 600 zeigte nur gegenüber Ampicillin, Gentamycin und Neomycin eine Empfindlichkeit. Der andere Stamm (Tagebuch-Nr. 432) war für Polymyxin B unemp-

Tab. 7: Ergebnis des Resistenztestes (n = 141 Stämme)

Chemotherapeutika	Empfindlich		Resistent	
	abs.	%	abs.	%
Ampicillin	105	74,4	36	25,6
Penicillin G	1	0,7	140	99,3
Gentamycin	133	94,3	8	5,7
Erythromycin	4	2,8	137	97,2
Tetracyclin	99	70,2	42	29,8
Nitrofurantoin	120	85,1	21	14,9
Chloramphenicol	99	70,2	42	29,8
Cotrimoxazol (Sulf/TMP)	116	82,3	25	17,7
Polymyxin B	139	98,6	2	1,4
Oxacillin	2	1,4	139	98,6
Streptomycin	92	65,2	49	34,8
Lincomycin	2	1,4	139	98,6
Sulfamethizol	97	68,8	44	31,2
Neomycin	121	85,8	20	14,2
Spectinomycin	101	71,6	40	18,4

findlich. Alle anderen getesteten Antibiotika hemmten das Wachstum dieses Stammes.

Eine erneute Anzüchtung und Klassifizierung dieses Stammes konnte nicht durchgeführt werden, da die Kultur bereits nach einigen Tagen abgestorben war. Nach dem Antibiotogramm handelte es sich um keinen coliformen Stamm.

3 Keimkulturen (Tagebuch-Nr. 307; 245; 743) waren gegenüber nur 2 Antibiotika empfindlich und zwar die Nr. 307 gegen Polymyxin B und Ampicillin, die Nr. 245 gegen Polymyxin B und Streptomycin und die Nr. 743 gegen Polymyxin B und Gentamycin.

4 Keime zeigten nur bei 3 Antibiotika eine Empfindlichkeit: Nr. 138 bei Polymyxin B, Neomycin und Gentamycin; Nr. 700 bei Polymyxin B, Gentamycin und Nitrofurantoin; Nr. 751 bei Polymyxin B, Ampicillin und Cotrimoxazol.

Das Wachstum aller anderen Keime konnte durch mindestens 4 verschiedene Antibiotika unterdrückt werden.

In Tabelle 8 sind die wirksamsten Antibiotika aufgeführt:

Tab. 8: Die wirksamsten Antibiotika

Antibiotika	empfindliche Keime in %
Polymyxin B	98,6
Gentamycin	94,3
Neomycin	85,8
Nitrofurantoin	85,1
Cotrimoxazol (Sulf-TMP)	82,3
Ampicillin	74,4
Spectinomycin	71,6
Chloramphenicol	70,2
Tetracyclin	70,2
Sulfamethizol	68,8
Streptomycin	65,2

Empfindliche coliforme Keime in %:



Abb. 7: Graphische Darstellung des Resistenztestergebnisses.

4.4. Die minimale Hemmkonzentration

Von den 141 isolierten coliformen Stämmen standen 117 Kulturen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration zur Verfügung. 24 Stämme, darunter 20 E.coli-Stämme und 4 andere coliforme Kulturen, gingen zugrunde. Die 117 Kulturen teilten sich auf in 102 E.coli und 15 andere coliforme Keime.

Die Untersuchungen wurden in drei Versuchsperioden durchgeführt. In der ersten Versuchsperiode, die am 16.12.1983 beendet war, konnten 9 Teststämme untersucht werden. In der zweiten Versuchsperiode (vom 26.12. bis 29.12.1983) wurden 50 und in der letzten (vom 8.1. bis 11.1.1984) 58 Testkeime

erfaßt. In der folgenden Tabelle sind die Ergebnisse der einzelnen Versuche aufgezeigt. Die Tabelle 9 gibt an, wieviele Teststämme pro Versuchsperiode bearbeitet wurden und welche minimale Hemmkonzentrationen bei welcher Zahl von Testkeimen festgestellt werden konnten.

Ein E.coli-Stamm (Tagebuch-Nr. 600), der schon im Resistenztest unempfindlich gegen Polymyxin B war, stellte sich auch bei der Bestimmung der MHK als resistent heraus, da noch bei der höchsten getesteten Wirkstoffkonzentration (128 $\mu\text{m/ml}$) ein deutliches Wachstum sichtbar war.

Tab. 9: MHK-Werte der einzelnen Versuchsperioden

MHK	1.Versuchs- periode	2.Versuchs- periode	3.Versuchs- periode
0,25	2	3	5
0,5	7	17	7
1,0	-	19	18
2,0	-	7	16
4,0	-	-	7
8,0	-	1	2
16,0	-	-	2
32,0	-	2	1
Resistent	-	1	-

Tab.10 : MHK-Werte aller coliformen Stämme (n = 117)

MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl d. Stämme	in %
0,25	10	8,6
0,5	31	26,7
1,0	37	31,9
2,0	23	19,8
4,0	7	6,0
8,0	3	2,58
16,0	2	1,72
32,0	3	2,58
64,0	-	-
resistent	1	0,86

4.4.1. MHK bei coliformen Keimen

Die minimalen Hemmkonzentrationen aller 116 empfindlichen coliformen Keime lagen in einem Bereich von 0,25 $\mu\text{g/ml}$ und 32 $\mu\text{g/ml}$.

Medianwert und Modalwert der festgestellten minimalen Hemmkonzentrationen liegen bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$.

Für 67% aller getesteten empfindlichen Stämme liegt die minimale Hemmkonzentration bei einem Wert von $\leq 1,0$ $\mu\text{g/ml}$.

Eine minimale Hemmkonzentration von $\leq 2,0$ $\mu\text{g/ml}$ stellte sich bei 87,0% aller coliformen Keime heraus.

Tabelle 10 zeigt, wieviele Stämme bei welcher Wirkstoffkonzentration in ihrem Wachstum gehemmt wurden.

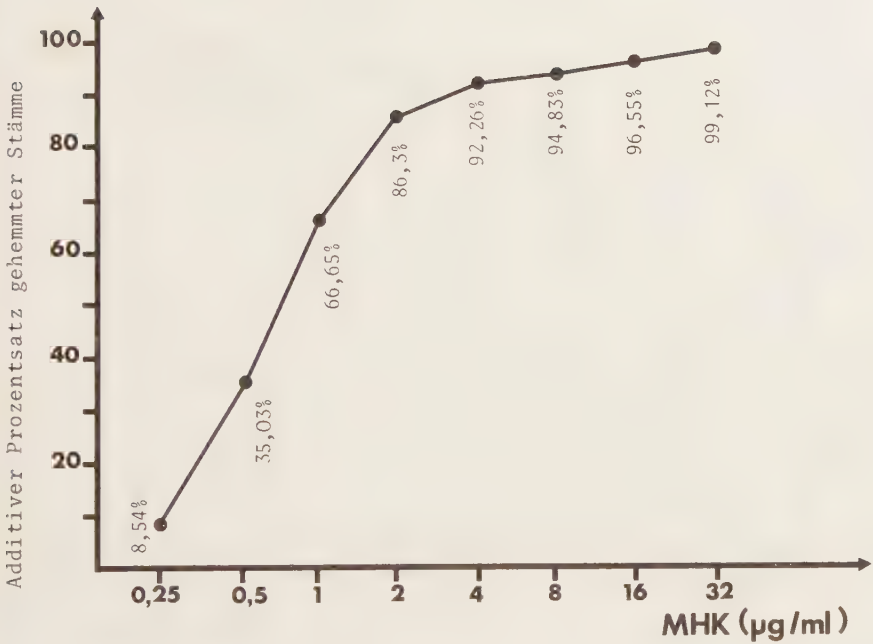


Abb. 8: Graphische Darstellung der MHK für alle untersuchten coliformen Keime.

4.4.2. MHK bei E.coli

Wenn für die Bestimmung der MHK nur die E.coli-Stämme berücksichtigt werden, ergeben sich folgende Resultate: Der Medianwert der minimalen Hemmkonzentration beträgt 1,0 µg/ml, der Modalwert ebenfalls 1,0 µg/ml. Bei 70,2% der empfindlichen Stämme ergibt sich eine minimale Hemmkonzentration von $\leq 1,0$ µg/ml, bei 88,1% ist sie $\leq 2,0$ µg/ml.

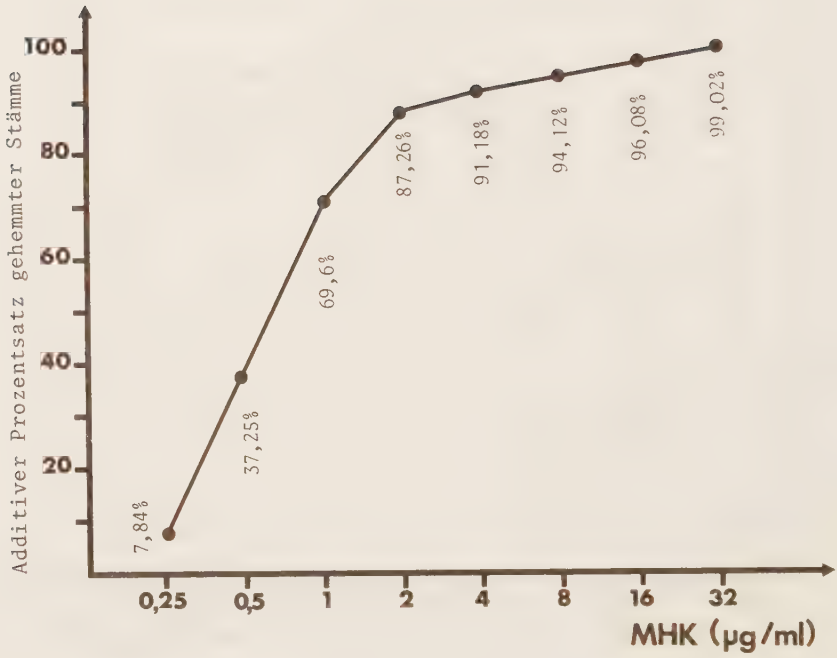


Abb. 9: MHK-Werte bei E.coli; graphische Darstellung.

In der Tabelle 11 sind die Ergebnisse zusammengefaßt.

Tab. 11 : MHK der untersuchten E.coli-Stämme (n = 102)

MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl der E.coli-Stämme	in %
0,25	8	7,84
0,5	30	29,41
1,0	33	32,35
2,0	18	17,66
4,0	4	3,92
8,0	3	2,94
16,0	2	1,96
32,0	3	2,94
resistent	1	0,98

4.4.3. MHK bei coliformen Keimen außer E.coli

Für die restlichen 15 coliformen Keime gilt:

Bei 46,6% der coliformen Keime liegt die minimale Hemmkonzentration bei $\leq 1,0 \mu\text{g/ml}$, bei 80% der coliformen Keime beträgt sie $\leq 2,0 \mu\text{g/ml}$. Im einzelnen sind die Resultate in Tabelle 12 abzulesen. Der Medianwert und der Modalwert für diese Stämme liegen bei $2,0 \mu\text{g/ml}$.

Tab. 12: MHK der coliformen Keime, außer E. coli (n = 15)

MHK (ug/ml)	Anzahl d. Keime	in %
0,25	2	13,3
0,5	1	6,7
1,0	4	26,7
2,0	5	33,3
4,0	3	20,0

Wegen der geringen Anzahl dieser getesteten Keime sind die Resultate nur in beschränktem Maße aussagekräftig.

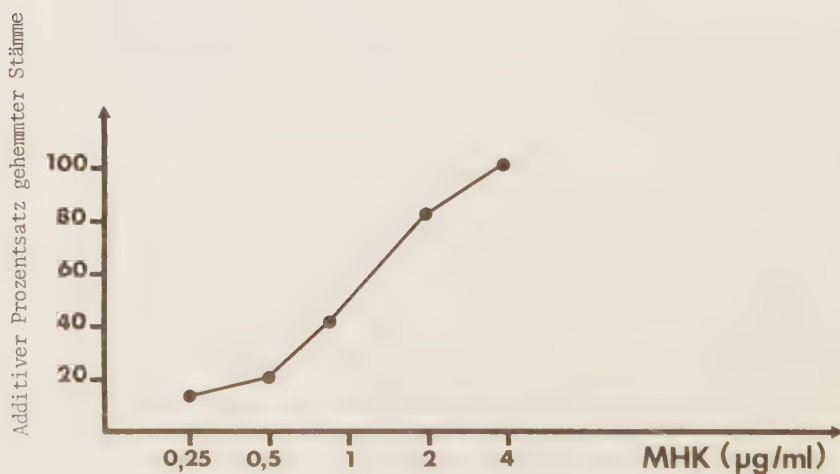


Abb. 10: MHK der coliformen Keime, außer E.coli, graphische Darstellung.

4.4.4. MHK beim Kontrollstamm

Auf jeder Platte wurde ein Kontrollstamm mit bekannter Empfindlichkeit mitgeführt. Die minimale Hemmkonzentration dieses Kontrollstammes lag in allen Versuchsperioden bei Werten zwischen 2 µg/ml und 4 µg/ml. Insgesamt konnten für den Kontrollstamm 16 mal 2,0 µg/ml und 8 mal 4,0 µg/ml als minimale Hemmkonzentration festgestellt werden.

Tab. 13: MHK-Werte des Kontrollstammes in den einzelnen Versuchsperioden.

MHK (µg/ml)	1.Versuchsperiode	2.Versuchsperiode	3.Versuchsperiode
2,0	1	5	10
4,0	1	5	2

Bei jeder Untersuchung wurden zwei wirkstofffreie Agar-Platten (eine beimpfte, eine unbeimpfte) mitgeführt. Auf den beimpften Platten zeigte sich ein deutliches Wachstum, während auf den unbeimpften Platten kein Wachstum zu sehen war.

5. DISKUSSION

5.1. Häufigkeit der coliformen Keime bei akuten Mastitiden

5.1.1. Methodik

Die Isolierung der coliformen Keime und die Differenzierung der E.coli-Stämme bereitete kaum Schwierigkeiten. In den allermeisten Fällen konnte durch die Kulturmorphologie, die Gram-Färbung und durch die Anzüchtung auf Endo-C-Agar eine klare Entscheidung getroffen werden. Keime, bei denen nicht absolute Klarheit über die Identität herrschte, kamen nicht zur weiteren Untersuchung. Besonders die Anzüchtung auf dem Endo-C-Agar gestaltete sich als einfache und sichere Differenzierungsmethode.

Der typische metallische Fuchsinglanz bei E.coli kam so eindrucksvoll zum Vorschein, daß eine weitere Differenzierung mit der von vielen Autoren geforderten "Bunten Reihe" nicht nötig war.

Nur ein Stamm (Tagebuch-Nr. 432) bereitete gewisse Schwierigkeiten. Auf Grund der oben beschriebenen Kriterien schien es sich um einen coliformen Stamm zu handeln. Das Ergebnis des Resistenztestes war jedoch so überraschend und atypisch (resistent gegen Polymyxin B; empfindlich gegen alle anderen Antibiotika), daß eine erneute Differenzierung vorgenommen werden sollte. Dies war jedoch nicht mehr möglich, da der Keim nach einigen Tagen bereits abgestorben war.

5.1.2. Ergebnis

Über den prozentualen Anteil von coliformen Keimen, die bei akuten Mastitiden isoliert wurden, sind in der Literatur viele Berichte mit unterschiedlichen Ergebnissen erschienen. Von 1058 akut entzündeten Eutervierteln isolierten WALSER et al. (1972) in 54,9% der Fälle coliforme Keime.

Die Angaben über die Beteiligung von coliformen Keimen an akuten Mastitiden reichen von 10,7% (ROTTERS, 1979) bis zu 66,9% (KALICH, 1958).

Der Anteil der coliformen Keime lag in der vorliegenden Untersuchung bei 42,2% und zeigte somit keine Abweichung von den bisher bekannten Werten.

5.2. Diskussion der Resistenzlage

5.2.1. Methodik

Der Resistenztest wurde gemäß dem in der Gynäkologischen Tierklinik München üblichen Routineverfahren durchgeführt. Die DIN-Vorschrift 58940 Teil 2 galt dabei als Grundlage, wurde aber nicht in allen Einzelheiten übernommen. Für die Routineuntersuchung und als Basis für die klinische Anwendung der Antibiotika ist die angewandte Blättchenmethode zur Resistenzbestimmung gut geeignet.

Es ist zu beachten, daß Spectinomycin und Polymyxin B auch bei hochempfindlichen Keimen nur kleine Hemmhöfe ergeben, Erythromycin, Tetracyclin, Chloramphenicol, Penicillin und Lincomycin dagegen relativ große.

5.2.2. Ergebnis

Für den praktischen Tierarzt ist es von großer Bedeutung, die Antibiotikaempfindlichkeit von bakteriellen Krankheitserregern abschätzen zu können, da beim Auftreten einer akuten Mastitis eine sofortige Antibiotika-Therapie angezeigt ist. Gerade bei der akuten Mastitis wird von den meisten Autoren, die sich mit diesem Thema beschäftigen, eine möglichst schnelle Behandlung mit wirksamen Antibiotika verlangt (WALSER et al., 1972b; HEIDRICH u. RENK, 1963). Der behandelnde Tierarzt muß also an Ort und Stelle eine Entscheidung treffen, welches Antibiotikum er einsetzen will. Als Entscheidungshilfe können Untersuchungen zu Rate gezogen werden, die die Resistenzlage des vermuteten Keimes darlegen.

Die vorliegende Arbeit zeigt, daß bei coliformen Keimen, die eine akute Mastitis verursachen, eine Resistenz gegenüber Polymyxin B nur zu einem geringen Prozentsatz (1,4%) vorkommt. Gentamycin weist eine Resistenzrate von 5,7% auf und hat somit noch eine sehr gute in vitro-Wirksamkeit.

Als anwendbare Antibiotika mit guter Wirksamkeit können desweiteren Neomycin (resistente Keime: 14,2%), Cotrimoxazol (= Sulfonamid-TMP, resistente Keime 17,7%) und Ampicillin (resistente Keime 25,6%) angesehen werden.

MC DONALD et al. (1977) berichten, daß mehr als 90% von 214 gramnegativen Mastitiserregern empfindlich gegenüber Polymyxin B, Gentamycin und Chloramphenicol waren.

Bei einer ähnlichen Untersuchung von coliformen Mastitiserregern fand RADOSTITIS (1970) für Nitrofurantoin 3,0%, für Chloramphenicol 7,4% und für Neomycin 9,6% resistente Keime. Polymyxin B, Colistin und Gentamycin berücksichtigte er bei seinen Untersuchungen nicht.

Etwas andere Ergebnisse veröffentlichte SARAN (1980); von 119 isolierten coliformen Keimen war kein Stamm gegen Ampicillin resistent. Andererseits stellte er fest, daß 27,7% gegen Colistin (= Polymyxin E) und 10,9% gegen Polymyxin B unempfindlich waren. Dieses Ergebnis ist insofern überraschend, da nach übereinstimmender Meinung zwischen Colistin und Polymyxin B eine völlige Kreuzresistenz besteht (SARAN, 1980, zit n. SOGAARD, 1983).

Nach SOGAARD (1983) trat bei 131 E.coli-Stämmen gegenüber Polymyxin B, Colistin und Gentamycin keine Resistenz auf. Von den anderen getesteten Antibiotika zeigten Chloramphenicol (7,5% resistente Keime) und Neomycin (13,6% resistente Keime) die beste Wirksamkeit. Ampicillin wies eine Resistenzquote von 22,6%, Tetracyclin 26,3% und Streptomycin 33,8% auf.

5.3. Diskussion der MHK-Bestimmung

5.3.1. Methodik

Grundsätzlich stehen zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration gemäß DIN 58940 zwei Methoden zur Verfügung:

1. Agar-Diffusionstest
2. Die Verdünnungsmethoden

Der Agar-Diffusionstest ist arbeitstechnisch leicht durchführbar, ist aber in Bezug auf die Exaktheit den Verdünnungsmethoden unterlegen (JONES et al., 1982).

Im Agar-Diffusionstest wird die MHK anhand der Hemmhofdurchmesser, die um ein wirkstoffhaltiges Papierblättchen auf einer beimpften Platte entstehen, bestimmt.

Die minimale Hemmkonzentration von Polymyxin B und Colistin kann mit dieser Methode nicht festgestellt werden, da Hemmhofdurchmesser und MHK dieser beiden Antibiotika nicht korrelierbar sind. Dies liegt an der geringen Diffusionsfähigkeit der Polymyxine (WALTER u. HEILMEYER, 1975).

Die Verdünnungsmethode steht in zwei Varianten zur Auswahl, einmal die Bouillon-Verdünnungsmethode und zum anderen die Agar-Verdünnungsmethode. Beide Arten zeichnen sich durch große Genauigkeit aus. Obwohl das Prinzip beider Verfahren gleich ist, wird der Agar-Verdünnungsmethode meist der Vorzug gegeben.

Die minimalen Hemmkonzentrationen wurden in den vorliegenden Untersuchungen analog den DIN-Vorschriften 58940 Teil 6 bestimmt. Die Durchführungsanleitungen sind dabei exakt angegeben und lassen keinen Spielraum für individuelle Variationen.

Für die Keimzahleinstellung des Inokulums, das 10^7 Keime pro ml enthalten soll, konnte ein Verfahren nach eigener Wahl angewandt werden.

Es gibt hierfür direkte und indirekte Verfahren. Unter den direkten Verfahren versteht man die mikroskopische Zählung

der Keime in Zählkammern. Diese Methode beinhaltet eine große Fehlerquote und kam deshalb nicht zur Anwendung.

Als indirektes Verfahren wäre die photometrische Keimzahlbestimmung zu erwähnen, wie sie von BLOBEL und SCHLIESSER (1979) beschrieben wird. Aufgrund der optischen Dichte einer Keimsuspension wird auf deren Keimgehalt geschlossen. Bei einer großen Anzahl von Untersuchungen bietet diese Methode wegen des geringen Zeitaufwandes Vorteile gegenüber den anderen Verfahren. Der Nachteil besteht jedoch darin, daß sowohl lebende als auch tote Keime erfaßt werden. Bei den vorliegenden Explorationen wurde das von ROLLE und MAYER (1984) geschilderte Oberflächenverfahren angewandt. Es zeichnet sich durch große Genauigkeit und einfache Ausführbarkeit aus.

Um möglichst viele Keime unter den gleichen Voraussetzungen testen zu können, wurden die Untersuchungen in nur drei Versuchsperioden durchgeführt.

Durch die geringe Anzahl der Versuchsabläufe konnten die Ergebnisschwankungen, die sich zwangsläufig bei jedem erneuten Versuchsaufbau ergeben, in Grenzen gehalten werden.

Der auf jeder Platte mitgeführte Kontrollstamm diente dazu, die Gleichmäßigkeit der einzelnen Versuchsabläufe zu überprüfen. Die MHK-Werte dieses Kontrollstammes lagen dicht beieinander und schwankten nur zwischen Werten von 2,0 µg/ml und 4,0 µg/ml. Bei 24 Versuchsdurchgängen ergab sich als MHK-Wert 16 mal 2,0 µg/ml und 8 mal 4,0 µg/ml.

Dieser enge Schwankungsbereich deutet an, daß die Versuche unter gleichbleibenden äußeren Bedingungen abliefen.

5.3.2. Ergebnis

In der Literatur sind mehrere Veröffentlichungen über die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration von Polymyxin B gegenüber E.coli bzw. coliformen Keimen erschienen.

WALTER und HEILMEYER (1975) geben als minimale Hemmkonzentration Werte von 0,1 µg/ml bis zu 20 µg/ml an. Die meisten E.coli-Stämme werden durch Polymyxin B-Konzentrationen von 0,5 µg/ml bis 2 µg/ml in ihrem Wachstum gehemmt. Die Werte haben jedoch nur bei E. coli-Stämmen des Menschen ihre Gültigkeit.

Ebenfalls für menschliche E.coli-Stämme gilt die minimale Hemmkonzentration, die GARROD et al. (1978) veröffentlichten. Sie liegt im Bereich von 0,02 µg/ml bis 11 µg/ml.

ZIV et al. (1980a) stellten die Empfindlichkeit von gramnegativen Keimen, die sie von Kühen und Kälbern isolierten, gegenüber Polymyxin B fest. Neben den coliformen Keimen waren in ihrem Untersuchungsmaterial noch Salmonellen enthalten. Insgesamt standen 592 isolierte Keimkulturen zur Verfügung. Resistente Keime traten nicht auf. Die MHK lag bei 75% aller Keime bei 1,0 oder 0,5 µg/ml. Für die restlichen 25% der Keime ergab sich eine MHK von 0,25 µg/ml.

In neuester Zeit erforschte SOGAARD (1982) die minimale Hemmkonzentration von Polymyxin B bei 131 E.coli-Stämmen, die er aus der Milch von Kühen isolierte. Die Keime stammten von routinemäßig durchgeführten bakteriologischen Milchuntersuchungen und aus Milchproben von Kühen, die an akuter Mastitis erkrankt waren. Nach seinen Untersuchungen wurden

96,6% der Keime bei einer Wirkstoffkonzentration von $\leq 2,0$ $\mu\text{g/ml}$ in ihrem Wachstum gehemmt. Im einzelnen publizierte er folgende MHK-Werte (Tab. 14).

Tab. 14: MHK von Polymyxin B bei E.coli (n =131).

MHK ($\mu\text{g/ml}$)	Anzahl d.E.coli-Stämme	E.coli in %
0,5	16	12
1,0	75	57,1
2,0	36	27,8
4,0	2	1,5
8,0	1	0,8
16,0	1	0,8
32,0	-	-
64,0	-	-
resistent	-	-

SCHIFFERLI et al. (1984) veröffentlichten ebenfalls MHK-Werte von Polymyxin B gegenüber E.coli. Der von ihnen angegebene MHK-Mittel-Wert liegt bei $1,53 \mu\text{g/ml}$. Die MHK-Werte liegen dabei in einem Intervall von $0,76 \mu\text{g/ml}$ bis $3,07 \mu\text{g/ml}$. In seinen Versuchen testete er 501 E.coli-Stämme.

Die in der vorliegenden Studie festgestellten MHK-Werte weichen in ihrer Tendenz nicht stark von Untersuchungsergebnissen anderer Autoren ab. Im Detail sind durchaus Unterschiede in den Resultaten erkennbar. Diese Unterschiede

sind jedoch oft methodischen Ursprungs, wobei sowohl unterschiedliche Technik, individuelle Interpretation der Ergebnisse als auch unterschiedliches Keimmateriale eine Rolle spielen. So kamen z.B bei SOGAARD (1982) E.coli-Stämme zur Untersuchung, die von chronischen und akuten Euterentzündungen stammten, während in der vorliegenden Arbeit nur akute Mastitiden berücksichtigt wurden.

Ziel der Dosierung eines Antibiotikums ist es, am Wirkungs-ort über eine bestimmte Zeit eine bestimmte Wirkstoffkonzentration zu erreichen. Die untere Grenze dieser Konzentration ist durch die minimale Hemmkonzentration gegeben. Das ist die Konzentration, bei welcher gerade die therapeutische Wirkung auftritt. Da die minimale Hemmkonzentration nicht nur die grundsätzliche Empfindlichkeit eines Keimes darstellt, sondern auch den Grad der Empfindlichkeit, ist sie die Grundlage für die Bestimmung einer therapeutischen Dosis.

Für eine endgültige Dosierungsangabe müssen auch die pharmakokinetischen Gegebenheiten berücksichtigt werden. So spielen Resorption, Inaktivierung, Verteilung und Ausscheidung eines Pharmakons eine entscheidende Rolle für die Dosierung. Die in der vorliegenden Untersuchung bestimmten MHK-Werte können somit als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen dienen, die unter Berücksichtigung der Pharmakokinetik die therapeutische Dosierung von Polymyxin B darstellen.

6. ZUSAMMENFASSUNG

1. Im Zeitraum März - Oktober 1983 wurden 334 Milchproben, die von Kühen mit akuter Euterentzündung genommen wurden, bakteriologisch untersucht.
2. In 141 Proben (42,2%) konnten coliforme Keime nachgewiesen werden.
3. Von diesen 141 coliformen Keimen wurden 122 (86,5%) als E.coli identifiziert.
4. Mit allen coliformen Keimen wurde ein Resistenztest durchgeführt. Das Antibiotikum mit der geringsten Resistenzquote war Polymyxin B (1,4% resistente Keime), gefolgt von Gentamycin (5,7% resistente Keime) und Neomycin (14,2% resistente Keime).
5. Die minimale Hemmkonzentration (MHK) von Polymyxin B wurde im Agar-Verdünnungsverfahren ermittelt. Medianwert und Modalwert der MHK für die untersuchten E.coli und coliformen Stämme liegt bei 1,0 µg/ml. Die festgestellten MHK liegen bei allen E.coli und coliformen Stämmen in einem Bereich von 0,25 µg/ml und 32 µg/ml. Ein E.coli Stamm ist gegenüber Polymyxin B resistent.

7. SUMMARY

In Vitro Susceptibility of Coliform Bacteria Isolated from Acute Bovine Mastitis to Polymyxin B.

1. During the period of March until October 1983, 334 quarter samples, isolated from acute mastitis in cows were bacteriologically examined.
2. In 141 samples (42.2%), coliform organisms were detected.
3. 122 strains (86.5%) of these coliform bacteria were identified as *E. coli*.
4. All coliform bacteria were examined in an disk agar diffusion antibiotic susceptibility-test. The most effective substance was Polymyxin B (1.4% resistant strains), followed by Gentamycin (5.7% resistant strains) and Neomycin (14.2% resistant strains).
5. The minimal inhibitory concentration (MIC) of Polymyxin B was determined by an agar-dilution method.
Median value and modal value of the MIC for the examined *E. coli* and coliform strains is 1.0 µg/ml. The detected MIC for all tested germs reach from 0.25 µg/ml to 32 µg/ml. One *E. coli* strain is resistant to Polymyxin B.

8. LITERATURVERZEICHNIS

- AHLERS, D., P. ANDRESEN, H. FRERKING, H. GLÄSSER, E. GRUNERT,
D. KRAUSE, K.-H. LOTTHAMMER, H. MERKT, G. ROSEN-
BERGER (1979): Buiatrik
3. Aufl. M. & H. Schaper Verlag, Hamburg
- BAINES, R.D., D. RIFKIND (1964): zit. nach GARROD, L.B. (1978):
Antibiotics and Chemotherapy. 4. Aufl., Churchill
Livingstone, Edinburgh
- BERCHTOLD, M. und E. GRUNERT (1977): Tierärztliche Geburts-
hilfe und Gynäkologie in Frage und Antwort.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1979): Handbuch der bakteriellen
Infektionen bei Tieren (Band 1).
Gustav Fischer Verlag, Jena
- BREYER, M.S., E.B. SCHOENBACH, E.A. BLISS (1949): Pharma-
cology of Polymyxin.
Ann. New York Acad. Sci. 51, 935-943
- BROWNLEE, G., S.R.M. BUSHBY, E.J. SHORT (1952): The Chemo-
therapy and Pharmacology of the Polymyxins.
Brit. J. Pharmacol., 7, 170-188
- CRAIG, W.A. and C.M. KUNIN (1973): Dynamics of binding and
release of the Polymyxin antibiotics by tissues.
J. Pharmac. Experim. Therap., 184, 757-765

DIERNHOFER, K. (1950): Diagnostik der Euterentzündungen.

Wien. Tierärztl. Mschr., 37, 809-866

DIN 58940 (1979): Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika.

Beuth Verlag, Berlin/Köln

FORTH, W., D. HENSCHLER, W. RUMMEL (1980): Allgemeine und spezielle Pharmkologie und Toxikologie.

3. Aufl., Bibliographisches Institut, Wissenschaftsverlag Mannheim/Wien/Zürich

FRIMMER, M. (1977): Pharmakologie und Toxikologie.

2. Aufl., F.K. Schattauer Verlag, Stuttgart/
New York

GARROD, L.B., H.B. LAMBERT, F.O'GRADY (1978): Antibiotics and Chemotherapy.

4. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh

HEIDRICH, H.J. und W. RENK (1963): Krankheiten der Milchdrüse bei Haustieren.

Paul Parey Verlag, Berlin/Hamburg

JONES, R.N., D.C. EDSON (1982): Interlaboratory performances of disk agar diffusion and dilution antimicrobial susceptibility tests.

Amer. J. Clin. Pathol. 78 (4 Supp.) 651-658

KALICH, J. (1958): Die Colimastitis des Rindes.

Dtsch. Tierärztl.Wschr. 65, 534-535

- KOCH-WESER, J., V.W. SIDEL, E.B. FEDERMANN, P. KANAREK, D.C. FINER, A.E. EATON (1970): zit. nach GARROD, L.B. (1978): Antibiotics and Chemotherapy. 4. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh
- KUNIN, C.M., A. BUGG (1971): zit. nach GARROD, L.B. (1978): Antibiotics and Chemotherapy. 4. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh
- LINDESMITH, L.A., R.D. BAINES, D.B. BIGELOW, T.L. PETTY (1968): zit. nach GARROD, L.B. (1978): Antibiotics and Chemotherapy. 4. Aufl., Churchill Livingstone, Edinburgh
- LINZENMEIER, G. (1972): Auswahl von Chemotherapeutika zur Resistenzbestimmung schnell wachsender Bakterien (Minimalforderungen). Dt.med.Wschr. 97, 303-304
- MORTON, S.B., E.B. SCHOENBACH, E.A. BLISS (1949): Pharmacology of Polymyxin. Am. New York Acad. Sc. 51, 935-943
- MC DONALD, J.S., T.J. MC DONALD, A.J. ANDRSON (1977): Antimicrobial sensitivity of aerobic gram-negative rods isolated from bovine udder infections. Amer. J. Vet.Res. 38, 1503-1507
- OBERMAYER, S. (1981): Feldversuch mit einem Kombinationspräparat von Ampicillin und Oxacillin zur intramammären Behandlung akuter Mastitiden des Rindes. Vet. med. Diss., München

- RADOSTITIS, O.M. (1970): The clinical aspects of coliform
mastitis in cattle.
Proc. VI. International Conference on Cattle
Disease, Philadelphia 1970, 67-74
- REIMER, L.G., C.W. STRATTON, L.B. RELLER (1981): Minimum In-
hibitory and Bactericidal Concentration of 44
Antimicrobial Agents Against Three Standard Control
Strains in Broth with and without Human Serum.
Antimicrob. Agents and Chemotherapy, 19, 1050-1055
- ROLLE, M. und A. MAYER (1984): Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenlehre.
4. Aufl., Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart
- ROTTERS, H. (1979): Untersuchung im Zusammenhang mit der akuten
Mastitis des Rindes und über den Wert einer Zusatz-
therapie mit Tomanol
Vet.med.Diss., Berlin
- SARAN, A. (1980): Survey on E. coli strains isolated from cases of
acute bovine mastitis and from cow's environment.
Proc. XI. International Congress on Diseases of Cattle,
Tel Aviv 1980, 56-62
- SCHIFFERLI, D., M. SCHÄLLIGBAUM, J. NICOLET (1984): Bestimmung
der Minimalhemmkonzentration bei Mastitisserregern beim Rind.
Schweiz. Arch. Tierheilk. 126, 23-24
- SIDDIQUE, J.W., K.J. LOKEN, H.H. HOYT (1965): Concentrations
of Neomycin, Dihydrostreptomycin and Polymyxin in
Milk After Intramuscular or Intramammary Administration.

- SOGAARD, H. (1982): In-vitro susceptibility of E.coli,
isolated from acute and chronic bovine mastitis
with reference to clinical efficacy.
Nordisc Vet. Med., 34, 248-254
- STANDARD METHODS FOR THE EXAMINATION OF DAIRY PRODUCTS (1967):
Am.Publ. Hlth. Assoc. N.Y. 12th ed.
- STILLE, W., P. SHAH (1973): Kinetik der Bakterizidie von
Ampicillin, Penicillin G, Carbenicillin, Cephalo-
thin, Kanamycin, Gentamycin, Polymyxin B, Sul-
famethoxazol/Trimethoprim gegenüber E.coli.
Arzneim.-Forschung (drug-res.), 23, 58-60
- VINNICOMBE, J., T.A. STAMEY (1969): zit.nach GARROD, L.B.
(1978): Antibiotics and Chemotherapy. 4. Aufl.,
Churchill Livingstone, Edinburgh
- WALSER, K., E.BIEBER, G. DANNERBECK, M. GROPPER, M. HROPOT,
H. LANKENFELD, J. MAYER, H. VERGHO, M. VIKTOR
(1972): Klinische Beiträge zur Kenntnis der
akuten Mastitis (Mastitis acuta gravis) des Rindes.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 85, 266-269, 305-
309, 330-333, 344-346, 364-366
- WALTER, A.M. und L. HEILMEYER (1975): Antibiotika Fibel.
4. Aufl., Georg-Thieme Verlag, Stuttgart
- WALTER, E. (1975): Biomathematik für Mediziner
B.G. Teubner Verlag, Stuttgart

- ZIV, G., F.G. SULMANN (1973): Permeability of the Mammary Gland to Large Antibiotic Molecules.
Zbl.Vet.Med., 20, 388-394
- ZIV, G., J. HARTMANN, M. TORTEN (1978): In vitro inactivation of endotoxin by Polymyxin B and Colistin in mastitic milk.
J. vet. Pharmacol. Therap. 1, 213-216
- ZIV, G., M. WANNER, J. NICOLET (1980a): Clinical pharmacology of Polymyxin B, Colistin and Colistimethate in young dairy calves.
J. vet. Pharmacol. Therap., 3, 87-94
- ZIV, G. (1980b): Availability and Usage of New Antibacterial Drugs in Europe.
J. Am. Vet. Med. Assoc., 176, 1122-1128
- ZIV, G., J.F.M. NOUWS, G.A.M. VAN GINNEKEN (1982a): The pharmacokinetics and tissue levels of Polymyxin B, Colistin and Gentamycin in calves.
J.vet.Pharmacol. Therap., 5, 45-58
- ZIV, G., W.D. SCHULTZE (1982b): Pharmacokinetics of Polymyxin B administered via the bovine mammary gland.
J. vet. Pharmacol. Therap., 5, 123-129
- ZIV, G., W.D. SCHULTZE (1983): Influence of intramammary infusion of Polymyxin B on the clinicopathologic course of endotoxin-induced mastitis.
Am. J. Vet. Res., 44, 1446-1450

Mein aufrichtiger Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Walser für die Überlassung des Themas und für seine geduldige und verständnisvolle Hilfsbereitschaft.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Dr. R. Preiser und allen anderen Kollegen, die mir beim Sammeln des Untersuchungsmaterials behilflich waren, wie auch den Mitarbeitern der Gynäkologischen und Ambulatorischen Tierklinik der Universität München, die mich bei der Durchführung der Versuche unterstützten.

LEBENS LAUF

Am 2.11.1954 wurde ich als drittes Kind des prakt. Tierarztes Dr. Michael Schneemeier und seiner Ehefrau Elisabeth Schneemeier, geb. Frank, in Zusmarshausen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule in Zusmarshausen trat ich 1966 in das humanistische Descartes-Gymnasium in Neuburg/Donau ein, wo ich 1975 das Abitur ablegte. Nach meinem 15-monatigem Militärdienst studierte ich im Wintersemester 1976/77 und im Sommersemester 1977 an der Universität Bern (Schweiz) zwei Semester Chemie. Im Studienjahr 1977/78 war ich an der Reichsuniversität in Gent (Belgien) im Studienfach Tiermedizin immatrikuliert. 1978 heiratete ich die Kinderkrankenschwester Waltraut Breitenhuber. Unter Beibehaltung meines Studienfaches wechselte ich zum Wintersemester 1978/79 an die Justus-Liebig Universität in Gießen. Im Januar 1983 wurde mir dort die tierärztliche Approbation zugesprochen. Von Januar bis Juli 1983 arbeitete ich in der Großtierpraxis von Dr. E. Weigl in Zusmarshausen. Seit Juli 1983 bin ich als freier Mitarbeiter in der Gemeinschaftspraxis Dr. Preiser - Dr. Prantl in Neuburg/Donau tätig. Im März 1983 begann ich mit den Untersuchungen zu der vorliegenden Dissertation.

